

THESIS

MUNICH

1964

Zur Methodik der Fibrinolyse-Bestimmung,
speziell der Papier-Fibrinolyse

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA

EBERHARD SCHOLLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

ZUR METHODIK DER FIBRINOLYSE-BESTIMMUNG,
SPEZIELL DER PAPIER-FIBRINOLYSE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
verfasst
und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Eberhard Scholle
aus Berlin

München 1964

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1964

Fotodruck PRÄZIS • Tübingen

Meinen Eltern gewidmet

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich
für die freundliche Überlassung des Themas.
Herrn Dr. A. Walcher und Herrn Professor
Dr. N. Goossens möchte ich vielmals für
die tatkräftige Hilfe und die wertvollen Rat-
schläge und Anregungen danken.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Physiologie der Fibrinolyse	3
A) Faktoren der Fibrinolyse	5
I) Aktivatoren der Fibrinolyse	5
II) Das Proferment und das Ferment	7
III) Die Inhibitoren der Fibrinolyse	9
IV) Weitere proteolytische Fermente und ihre Beziehungen zum Plasmin	11
B) Mechanismus der Fibrinolyse	11
1) Das Zustandekommen der Aktivatoraktivität	11
2) Die Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin	13
3) Die Spaltung des Fibrins durch Plasmin	14
4) Änderungen im fibrinolytischen System durch verschiedene Einflüsse	15
Fibrinolytische Therapie	17
Nachweismethoden	19
Testsubstrate	19
Methoden zur Fibrinmessung	20
Fibrinolyse nachweismethoden	20
Antiplasminbestimmungen, Antistreptokinase- und Antithrombinbestimmung	22
Experimenteller Teil	26
Materialien und Geräte	26
A) Methode	26
I) Herstellung der Fibrinpapierfolie	27
II) Der Testansatz	31
III) Die Auswertung	33
IV) Fehlerberechnung der Methode	37
V) Zusätzlich verwendete Methoden	39
1) Der Streptokinaseresistenztest	39
2) Die Spontanfibrinolyse	40

	Seite
Ergebnisse	41
Gleichmäßigkeit der Fibrinimprägnation der Folien	41
Empfindlichkeit verschieden präparierter Fibrinpapier- folien gegenüber der Fibrinolyse	43
Haltbarkeit der Fibrinpapiere bei der Aufbewahrung	44
Untersuchungen zur Wässerung der inkubierten Fibrinpapiere	45
Anwendung der epsilon-Aminocapronsäure als Inhibitor der SK-aktivierten Fibrinolyse	47
Zur Beurteilung des fibrinolytischen Potentials eines Plasmas	49
Zusammenhänge zwischen Papierfibrinolysequoten, Lebensaltern und einigen klinischen Befunden der Probanden	53
Papierfibrinolyse und Streptokinaseresistenztest	54
Papierfibrinolyse und Spontanfibrinolyse	54
Papierfibrinolyse und Veränderungen in der Zusam- mensetzung des Blutes bzw. des Blutserums	55
Lysequoten bei verschiedenen Krankheitsgruppen	57
Diskussion	58
Zusammenfassung	65
Literaturangaben	67
Anhang mit Abbildungen	82
Lebenslauf	

EINLEITUNG

Die allgemeine Bedeutung der Fibrinolyse für die Erhaltung wichtiger physiologischer Funktionen wurde erst in den letzten zwei Jahrzehnten immer deutlicher, obwohl schon 1761 Morgagni die Verflüssigung von Leichenblutgerinnseln beschrieben hat, 1838 Denis von der spontanen Verflüssigung des Blutgerinnsels in Restplasma berichtete und Dastre dann 1893 erstmals den Ausdruck Fibrinolyse für die Auflösung von Fibringerinnseln gebrauchte (aus 91 und 133).

Verhindert die Blutgerinnung bei Verletzung von Gefäßen einen zu großen Blutverlust, so begünstigt die Fibrinolyse durch allmähliche Auflösung des Gerinnsels die nachfolgende bindegewebige Reparation. So ist nach Astrup (11) für jede Wundheilung überhaupt ein normales fibrinolytisches System unerlässlich.

Sherry, Fletcher und Alkjaersig (129) sehen in dem Gerinnungsvorgang und der anschließenden Fibrinolyse einen grundlegenden Mechanismus der Reparation auch bei allen akuten Entzündungen. Außerdem soll die Anwesenheit fibrinolytischer Faktoren die Ausbildung von Adhäsionen und Schwarten bei Entzündungen der Brust- und Bauchhöhle verhindern (76, 144).

Für den normalen Ablauf der Menses spielen ebenfalls fibrinolytische Faktoren eine bedeutende Rolle (91).

Das Vorkommen von Faktoren des fibrinolytischen Systems in den verschiedensten Sekreten (11) wird dahin gedeutet, daß es der Offenhaltung enger Drüsenausgänge dient (41, 76).

Ein ganz besonderes Interesse wird heute der Ansicht einiger Autoren (11, 12, 41, 70) entgegengebracht, es bestehe wahrscheinlich ein Zusammenhang zwischen einem gestörten Fibrinolysesystem und der Entstehung von arteriosklerotischen und thrombotischen Veränderungen.

Schon 1908 nahm Nolf (105) an, daß im Gefäßsystem ein Gleichgewicht zwischen Fibrinablagerung und Fibrinauflösung herrschen müsse. Gerade in den letzten Jahren wurde die Bedeutung dieses Gleichgewichtes für die normale Funktion der Gefäßwand wiederholt betont (11, 12, 51, 76, 123, 133).

Für diese dauernde fibrinoplastisch - fibrinolytischen Vorgängen im Gefäßsystem spricht vielleicht auch die kurze Lebensdauer der Gerinnungsfaktoren (58, 70).

Deutsch (41) umreißt die Entwicklung der Bedeutung der Fibrinolyse mit dem Satz: während früher die Fibrinolyse nur für die Grundlagenforschung von Interesse war, ist sie heute als pathogenetisches Prinzip zur Erklärung verschiedener Erkrankungen und als Instrument therapeutischen Vorgehens wichtig.

PHYSIOLOGIE DER FIBRINOLYSE

Das ursprünglich von Astrup (9, 10) und Müllertz (99) aufgestellte Fibrinolyse-schema wird heute ganz entsprechend dem Gerinnungsschema in 3 Phasen gegliedert (41, 65, 85, 133):

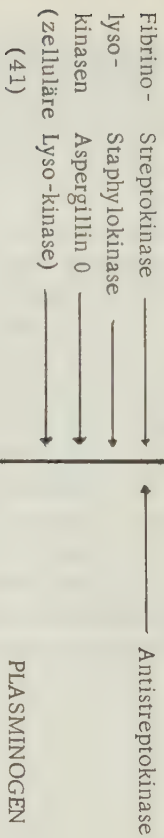
1. Phase (Vorphase) : Prokinase wird in Kinase überführt
2. Phase : inaktives Proferment wird zu aktivem Ferment
3. Phase : Protein wird in Peptide gespalten.

Bei der Fibrinolyse ergeben sich dann folgende Vorgänge:

1. Phase: a) der Proaktivator (Profibrinolysokinase) im Plasma wird in den Aktivator (Fibrinolysokinase) umgewandelt, und zwar spontan (Vorgang ungeklärt) oder durch Streptokinase (SK).
b) ein Gewebs- bzw. zellulärer Aktivator (Gewebsfibrinolysokinase) oder ein Aktivator aus einer Körperflüssigkeit wird frei.
2. Phase: die genannten Aktivatoren überführen das im Plasma vorliegende inaktive Proferment Plasminogen (Profibrinolysin) in das Ferment Plasmin (Fibrinolysin).
3. Phase: in dem eigentlichen Vorgang der Fibrinolyse spaltet das Plasmin das Fibrin (MG 330 000) in größtenteils noch mit Trichloressigsäure fällbare Fibrinopolypeptide (MG 100 000) (133).

Das folgende Schema stellt die genannten Vorgänge dar und gibt gleichzeitig einen Überblick über Aktivatoren und Inhibitoren der Fibrinolyse:

PROAKTIVATOR (Blut)



AKTIVATOR (Blut)

PLASMINOGEN

Gewebsaktivatoren (Leukozyten?)

Urokinase
Chloroform
Trypsin
"spontan"

Antikinasen
epsilon-Amino Capron-Säure (eACS)

PLASMIN

Antiplasmin
eACS
Sojabohneninhibitor
Pankreasinhibitor

FIBRIN

FIBRINOPEPTIDE

A) FAKTOREN DER FIBRINOLYSE

In eingehenden Untersuchungen wurde gerade in den letzten Jahren versucht, Klarheit über die bei den Fibrinolysevorgängen beteiligten Faktoren zu erlangen. Hier soll darüber kurzgefaßt berichtet werden.

I. DIE AKTIVATOREN DER FIBRINOLYSE

a) Endogene, direkte Aktivatoren

- 1) Es gibt einen Plasmaaktivator, der aus dem stabileren Proaktivator entsteht (11), löslich und sehr labil ist und wie ein Enzym wirkt. Er kann mit dem Blut in alle Organe gelangen, somit also eine generalisierte Fibrinolyse auslösen. Der Proaktivator ist im Blut gegenüber dem Plasminogen in großem Überschuß vorhanden (14, 98). Vielleicht stammen Aktivator bzw. Proaktivator des Blutes aus den Gefäßwänden. So wurde verschiedentlich (8, 27, 93) festgestellt, daß die Stauung bei der Blutabnahme die fibrinolytische Aktivität dieses Blutes erhöht. Fearnly (49, 51) vermutet deshalb, daß der Ursprung der "labilen fibrinolytischen Komponente" in der Peripherie, in der Vene selbst oder im Gewebe zu suchen ist. Es wurde auch festgestellt, daß venöses Blut fibrinolytisch aktiver ist als arterielles (12, 24, 49).

Todd (136) fand in Gewebsschnitten, die er mit einer besonderen Methode auf fibrinolytische Aktivität untersuchte, eine gesteigerte Aktivität in der Umgebung von Venen.

- 2) Sehr eingehend wurden die Gewebsaktivatoren der Fibrinolyse untersucht. Sie sind vorwiegend an unlösliche Gewebsproteine gebunden und ziemlich thermostabil (11).

Ihre Wirksamkeit ist von vorwiegend lokaler Bedeutung, sie können bei Verletzungen frei werden (133).

Der Mensch steht mit dem Gehalt an Gewebsaktivatoren an der Spitze in der Tierreihe (12). Albrechtsen (4) fand erhebliche Schwankungen des Gehaltes an Gewebsaktivatoren für ein Organ von Mensch zu Mensch.

Organe mit hohem Aktivatorgehalt wie Uterus, Prostata, Lunge, Schilddrüse und Nebenniere (4) haben eine latente Tendenz zu Blutungen (11).

Bierstedt (24) behauptet, daß die Aktivatoraktivität der Extrakte aus Skelettmuskulatur und Lunge von Leichen ausreicht, rein quantitativ die fibrinolytische Aktivität der Körperflüssigkeiten zu erklären. Er fand Liquor,

Körperhöhlenflüssigkeit und Harn bei Leichen nur dann fibrinolytisch aktiv, wenn der Zeitpunkt der fibrinolytischen Aktivierung noch innerhalb der erhaltenen Herztätigkeit gelegen war.

- 3) Auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Hydrozelen, Hygromen, Hydrarthrosen, Amnionflüssigkeit- (Olesen, 109) und Sekreten (Speichel, Frauenmilch, Tränen- und Samenflüssigkeit (11, 51)) wurden Faktoren des fibrinolytischen Systems nachgewiesen, und zwar wechselnde Mengen von Aktivator, große Mengen an Proaktivator und unterschiedliche Mengen von Inhibitoren.

Alle Transsudate sollen ein hohes fibrinolytisches Potential, seröse Exsudate dagegen höchstens eine schwache fibrinolytische Aktivität besitzen (144).

- 4) Im Urin kommt eine fibrinolytisch aktive Substanz vor, die isoliert werden konnte (66). Sie wird als Urokinase (UK) bezeichnet und aktiviert Plasminogen direkt.

v. Kaulla (80) beschreibt, daß er durch Einwirken von frischem, klaren Urin auf Plasma und anschließender Dialyse eine hochaktive fibrinolytische Substanz (Plasmin) erhielt.

b) Exogene, indirekte Aktivatoren der Fibrinolyse

Diese Aktivatoren sind von besonderem Interesse für die fibrinolytische Therapie.

- 1) 1933 beschrieben Tillett und Garner (135) die fibrinolytische Aktivität von hämolytischen Streptokokken. Diese fibrinolytisch aktive Substanz wird aus Kulturen bestimmter hämolytischer Streptokokken gewonnen (37). Heute kann diese Substanz - Streptokinase (SK) - so weit gereinigt hergestellt werden, daß sie weitgehend atoxisch auch in größeren Dosen zur fibrinolytischen Therapie angewandt werden kann (41).

Ursprünglich wurde die Streptokinase (SK) selbst für ein fibrinolytisches Ferment gehalten (135). Später zeigte sich, daß in Rinderplasma nur dann eine Fibrinolyse erzeugt werden konnte, wenn dem Rinderplasma außer SK Humanplasma zugesetzt wurde. - Humanplasma enthält nach Astrup (97) einen Proaktivator, der durch die SK in einen Aktivator des Plasminogens überführt wird.

Später wurde die Frage diskutiert (17, 41), ob die SK wirklich einen Proaktivator benötigt oder mit Plasminogen direkt einen Komplex bildet, der Aktivatorfunktion hat. Sherry und Alkjaersig (128) sind der Ansicht, daß für die Wirkung der SK ein Plasmafaktor erforderlich ist, der noch nicht vom Plasminogen getrennt werden konnte.

Doleschl und Auerswald (43) glauben den Nachweis geführt zu haben, daß Proaktivator und Plasminogen nicht identisch sind.

Bei der indirekten Aktivierung des Plasminogens durch SK entstehen nach Troll (138) im Plasminogen-SK-Gemisch zwei Faktoren, die durch Fraktionierung getrennt werden können. Der eine Faktor ist eine reine Lysinesterase, der andere ein Enzym mit proteolytischer Wirkung. Nach seiner Ansicht verläuft die Aktivierung des humanen Plasminogens durch SK in zwei Stufen:

- 1) Eine stöchiometrische Reaktion der SK mit dem Plasmafaktor führt zur Bildung des Aktivators, der die Eigenschaften einer ausschließlich Lysinester spaltenden Enzymes hat.
- 2) Das Plasminogen wird durch diesen Aktivator aktiviert.
- 2) Eine ähnliche Wirkung wie die SK wird für die Staphylokinase beschrieben (52, 129). Dieses Ferment wird von Staphylokokken gebildet und ist am besten von frisch isoliertem Mikrokokkus aureus zu gewinnen (37).
- 3) Peptone haben in vivo und in vitro einen aktivierenden Einfluß auf die Fibrinolyse (91, 110, 129).
- 4) Pyrogene und
- 5) Nikotinsäure (145) und Nikotinsäureamidderivate wurden zur fibrinolytischen Therapie versucht (41) und sind nur in vivo wirksam.

Der Wirkungsmechanismus der drei letztgenannten "Aktivatoren" ist noch weitgehend ungeklärt. Deutsch (41) nimmt an, daß bei Pyrogeninjektionen aus den Leukozyten ein stabiler Faktor befreit wird, denn 1 - 3 Stunden nach der Injektion tritt eine Leukopenie, dann für mehrere Stunden eine Leukozytose ein.

II) DAS PROFERMENT UND DAS FERMENT

- 1) Das Plasminogen ist die inaktive Vorstufe des fibrinolytischen Fermentes im Plasma. Es kann durch die oben genannten direkten Aktivatoren in das aktive Ferment Plasmin überführt werden.

Das Plasminogen hat die Eigenschaften eines Globulins und findet sich konzentriert in der Plasmafraktion III nach Cohn. Es ist fällbar bei $pH\ 5,3$ bei niedriger Ionenstärke (129). Kline (84) hat Plasminogen durch Säureextraktion kristallin dargestellt, allerdings enthielt es noch 30 % Verunreinigungen. - Plasminogen ist im Plasma stabiler als im gereinigten System, es hält sich bei $4^{\circ}C$ mehrere Tage ohne Aktivitätsverlust (146). - Es ist außerdem ziemlich stabil gegen pH -Änderungen; Erhitzung auf $56^{\circ}C$ erträgt es für 1/2 Stunde, bei $70^{\circ}C$ wird es langsam zerstört (111).

Im Elektropherogramm findet sich das Plasminogen zwischen der beta- und gamma-Zacke, näher der gamma-Zacke (108). Reinstes Plasminogen wird

in 50 %iger Glycerinlösung in 1 Woche bei 30° C und p_H 7,6 autokatalytisch in aktives Plasmin umgewandelt, dabei entstehen 30 % säurelösliches Tyrosin (128).

Plasminogen soll endständig einen Lysin- und einen Serinrest pro Molekül enthalten (131).

Bei der Umwandlung des Plasminogens in Plasmin durch SK soll das Serin durch Leucin ersetzt werden. Die Aktivierung zu Plasmin ist zwischen p_H 4 und p_H 10 möglich ohne signifikante Änderung der Aktivität nach 24 Stunden Inkubation (111).

- 2) Das Plasmin ist das aktive proteolytische Ferment. Es ist nach Sherry, Fletcher und Alkjaersig (129) bei neutralem p_H aktiv aber auch instabil. - Das p_H - Optimum wird bei Macfarlane und Biggs (91) mit 7,4, bei Permin (111) mit 6,0 bis 6,5 angegeben.

Plasmin wird bei 56° C langsam, bei 70° C schnell zerstört. Weitere eingehende Analysen des Plasminogens und Plasmins finden sich bei Shulman, Alkjaersig und Fletcher (130), Sherry und Alkjaersig (128) und Davies und Englert (35). Plasmin besitzt nach Koller (85) eine gewisse Substratspezifität, denn es kann an Fibrin adsorbiert werden. Im gereinigten System oder bei hochaktiver Lyse wird jedoch auch die Vorstufe des Fibrins, das Fibrinogen gespalten, und zwar genauso schnell wie das Fibrin (31, 114, 128).

Bei SK-Aktivierung soll die Fibrinolyse schneller ablaufen als die Fibrinogenolyse (114).

Außerdem kann Plasmin folgende Eiweißkörper spalten:

in vivo: Gerinnungsfaktoren I, II, V, VIII und IX (41, 115), das Komplex (41, 128), Hormone: ACTH, STH und Glukagon (85, 115, 129).

in vitro: Kasein, Gelatine, denaturiertes Hämoglobin, beta-Lactoglobulin, Azokoll, synthetische Ester von Arginin und Lysin und Protamin-komplexe (85, 115).

Loomis (89) und Christensen (32) haben folgende Definitionen für eine Einheit der fibrinolytischen Aktivität des Plasmins gegeben:

- a) Eine Loomis-Einheit ist diejenige Menge Plasmin, die 1 ml eines 0,3 %igen Fibringerinnsels in 120 sec. bei p_H 7,2 und 45° C in einer isotonischen, mit Imidazol gepufferten Salzlösung auflöst. Normalplasma: 400 - 900 E/ml
- b) Eine Christensen-Einheit: jene stärkste Serumverdünnung enthält eine Einheit Plasmin, die das Fibrinogen in 0,4 ml einer 0,5 %igen Rinderfibrinogenlösung von p_H 7,4 - 7,5 bei 35° C in 30 min auflöst. Normalplasma enthält 572 E/ml.

Weitere Einheiten: Fibrin-, Kasein-, TAME-, LEe-Einheiten (133).

III) DIE INHIBITOREN DER FIBRINOLYSE

Übersicht in Anlehnung an Sherry, Fletcher und Alkjaersig (129) und Deutsch (38).

a) Spezifische Inhibitoren im Plasma

- 1) Inhibitoren der Aktivierung: Antistreptokinase
Antiaktivator (?)
- 2) Inhibitoren des Plasmins: ein Antiplasmin in der Albuminfraktion, 2 Antiplasmine in der alpha-Fraktion des Serumeiweißes.

b) Unspezifische Inhibitoren:

Heparin und ähnliche Substanzen (siehe auch v. Kaulla (81) und Olesen (110)), basische Aminosäuren, ihre Polymere und Ester, quaternäre Amine, Methylamin, epsilon-AminoCapron-Säure (eACS), Trypsininhibitor, Pankreas- und Soyabohneninhibitor und anorganische Ionen: Schwermetalle.

a1) Die Antistreptokinase (ASK) hemmt die Aktivierung des fibrinolytischen Systems durch SK, was besonders bei der fibrinolytischen Therapie mit SK beachtet werden muß, da die ASK-Titer erheblich schwanken (41). - Besonders stark erhöht sind die Titer nach Streptokokkeninfektionen oder nach SK-Therapie. Nach SK-Infusion steigt der Titer in 10 Tagen stark an, erreicht nach einem Monat sein Maximum und wird nach 3 - 6 Monaten wieder normal (41, 53, 65).

a2) Die spezifischen Plasmininhibitoren sollen sich in der Albuminfraktion (69, 91) und in der alpha-Globulinfraktion (69, 107, 108, 118) aus dem Serum abtrennen lassen. Nach Norman (108) soll sich konstant und mit geringen Schwankungsbreiten im menschlichen Plasma 20 - 30x mehr Inhibitor befinden als Plasmin.

Die beiden Inhibitoren aus der alpha-Globulinfraktion sind genauer untersucht worden (69, 106, 107).

Nach Norman (107) sind beide bei p_H -5, 5-10,5 stabil, während jenseits dieser Grenzen ein starker Aktivitätsverlust eintritt.

In der alpha-1-Fraktion ist ein Antiplasmin enthalten, das langsam, temperatur- und konzentrationsabhängig reagiert, hitzelabil ist und mit Plasmin einen festen Komplex bildet. Dieser Inhibitor soll so reichlich im Organismus vorhanden sein, daß er das 30fache des potentiellen Plasmins binden könnte (41). Dieses alpha-1-Antiplasmin ist vorwiegend ein Trypsininhibitor (107).

In der alpha-2-Fraktion des Serumeiweißes ist das alpha-2-Antiplasmin enthalten: es ist hitzelabiler und reagiert schlagartig und unabhängig von der Temperatur mit Plasmin, mit dem es eine lockere, leicht dissoziierbare Bindung eingeht. Es kann schlagartig 50 % des zu einem Plasma zugesetzten Plasmins neutralisieren (41).

Fibrin kann das Plasmin aus diesem Plasmin-Antiplasmin-Komplex heraus adsorbieren (7, 31, 106). Die Inhibitoren können dagegen nicht an das Fibrin adsorbiert werden (3). "Antiplasmin" schützt normalerweise die Gerinnungsfaktoren und andere aktive Einweißkörper im Blut vor der Proteolyse (7).

Es wurden außerdem in Thrombozyten Inhibitoren gefunden (93, 128).

Die Thrombozyten sollen nach Bierstedt (26) aber nur dann einen hemmenden Einfluß haben können, wenn sie aus fibrinolytisch inaktivem Plasma stammen. Sherry und Alkjaersig (128) beschreiben, daß das Thrombozyten-Antiplasmin im Gegensatz zum Serumantiplasmin schlagartig auf Plasmin einwirke.

Weiter sollen Erythrozyten in toto und nach Hämolyse auf die Fibrinolyse hemmend wirken (18).

- b) Unter den unspezifischen Inhibitoren der Fibrinolyse sind Aminosäuren mit Ketten von 4 - 6 C-Atomen und der Aminogruppe in Omegastellung besonders wirkungsvoll. Von diesen besitzt die epsilon-Amino-Capronsäure (eACS) die stärkste Inhibitoraktivität (alpha-ACS dagegen ist inaktiv) (132).

Die eACS ist in erster Linie ein Inhibitor des Aktivators, erst in zweiter Linie ein Inhibitor des Plasmins (2, 65, 85).

de Nicola (104) untersuchte die eACS in ihrer Wirkung auf ein Euglobulin-SK-Gemisch. Er fand dabei, daß:

bei 12,5 - 3,12 mg% eACS keine Lyse

bei 1,56 - 0,78 mg% eACS Spuren von Lyse

bei 0,39 mg% eACS leichte Lyse eintrat.

Deutsch (41) gibt an, daß bei 0,01m eACS-Lösung 50 %,

bei 0,05m eACS-Lösung 100 %

der Aktivatoraktivität gehemmt werden.

Bei 0,06m eACS wurde auch Plasmin gehemmt.

Außer der SK-Aktivierung hemmt eACS (0,025m) auch die Aktivierung durch Urokinase (UK) (3).

Sie kann die SK-Aktivierung des Plasminogens aber nur im Plasma, nicht im Gerinnsel hemmen. Das trifft allerdings nur zu, wenn im Gerinnsel Plasminogen angereichert ist - eACS wird nicht an Fibringerinnsel adsorbiert (3).

Ein weiterer wirksamer synthetischer Inhibitor des Plasmins ist das Trasylol (41, 65).

IV) WEITERE PROTEOLYTISCHE FERMENTE UND IHRE BEZIEHUNGEN ZUM PLASMIN

Plasmin ist vielfach mit Trypsin verglichen worden; heute können beide eindeutig als zwei differente Fermente bezeichnet werden (121, 127, 128, 129). Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin zeigen im gereinigten System das gleiche Verhältnis von proteolytischer zu fibrinolytischer Aktivität (127), doch ist Trypsin ungefähr 35x aktiver als das aktivste Plasminpräparat (128).

Eine weitere bedeutungsvolle proteolytische Aktivität wurde im Thrombin gefunden; es soll mit zunehmender Thrombinaktivität bei der Gerinnung die anschließende Fibrinolyse schneller ablaufen (124, 146).

Andere Untersucher dagegen fanden, daß Thrombin in Konzentrationen über 5 E/ml ein Inhibitor der Lyse sei (27).

Eichenberger (44) untersuchte dann die fibrinolytische Aktivität des Thrombins eingehender. Er ging davon aus, daß a) das Thrombin mit einem Faktor des fibrinolytischen Systems verunreinigt sein könnte. - b) die Gerinnungsaktivität und die fibrinolytische Aktivität Ausdruck desselben proteolytischen Fermentes sein könnten. - Er konnte das Thrombin elektrophoretisch in 4 Komponenten auftrennen, von denen 2 vermutlich keine Thrombinwirksamkeit zeigen. Endgültig geklärt wurde die Frage nicht.

Seegers (126) untersuchte später das Thrombin und fand 2 Thrombinaktivitäten, die er als Thrombin C (clotting) und als Thrombin E (esterase) voneinander unterschied. - Thrombin C bringt Fibrinogen zur Gerinnung und kann das Gerinnsel auch wieder auflösen. Thrombin E kann Fibrinogen nicht zur Gerinnung bringen, aber das Gerinnsel auflösen, seine Aktivität wird bei Inaktivierung des Thrombin C verdoppelt.

B) MECHANISMUS DER FIBRINOLYSE IN VIVO UND IN VITRO

1) Das Zustandekommen der Aktivatoraktivität

Die spontane Aktivierung des Plasminogens wird nach Müllertz (98) durch einen spontan im Plasma auftretenden Aktivator hervorgerufen. Doch dieser Vorgang ist noch weitgehend ungeklärt, wahrscheinlich wegen der Labilität dieses Aktivators, der wohl mit dem Plasminogenaktivator von Fearnly (47, 51), der "labile fibrinolytic component" identisch ist. Dieser Faktor kann nach der Blutabnahme nur dadurch aktiv erhalten werden,

daß das Blut tiefgekühlt wird und möglichst schnell zur Gerinnung gebracht wird - der Aktivator wird nämlich durch Adsorption an Fibrin stabilisiert.

Doleschl und Auerswald beschreiben eine spontane Aktivierung, bei der die Aktivatorbildung bei 25° C langsam abläuft, bei 37° C jedoch schnell ansteigt und nach 60 Stunden ein Maximum erreicht. Das Freiwerden von Gewebsaktivatoren hat nur lokale Bedeutung (11, 133); bei größeren Verletzungen oder Operationen - besonders Lungenoperationen (85) - sollen Gewebsaktivatoren eine generalisierte Fibrinolyse hervorrufen können.

Eine große Bedeutung hat heute die Möglichkeit, durch Streptokinase (SK) den Proaktivator in den Aktivator zu überführen. Diese Aktivierungsmöglichkeit ist sowohl in vitro (für Nachweismethoden) als auch in vivo (für eine Fibrinolysetherapie) sehr eingehend untersucht worden.

Bei der Beurteilung der durch SK im Plasma ausgelösten fibrinolytischen Aktivität müssen die beiden im menschlichen Plasma vorkommenden Hemmstoffe der SK berücksichtigt werden (41). Der wichtigere von beiden ist die Immunoantistreptokinase - es können vom Gesamtblut zwischen 25 000 und 1 Million Einheiten SK neutralisiert werden.

Alkjaersig, Fletcher und Sherry (6) fanden bei SK-Mengen bis 25 000 E/ml eine steigende Aktivatoraktivität, wobei bei 100 E/ml ein Plateau der proteolytischen Aktivität beginnt. Bei 3 000 E/ml nimmt die proteolytische Aktivität dann wieder ab.

Auerswald und Doleschl (14) erreichten bei der SK-Aktivierung eines Euglobulingemisches eine Grenze der Aktivatorbildung bei 1 000 E/ml SK pro mg Euglobulingemisch.

Verschiedene Autoren (6, 19, 53, 60) beschreiben eine hemmende Wirkung hoher SK-Konzentrationen auf die Fibrinolyse in vitro.

Die Wirkung der SK in vivo (bei der Fibrinolysetherapie) deutet Deutsch (41) folgendermaßen: In der ersten Wirkungsphase finden sich Proaktivator und Plasmin im strömenden Blut. Im weiteren Verlauf nehmen Proaktivator und Antiplasmin ab, ohne völlig verbraucht zu werden. Das Plasminogen nimmt schnell ab; dann verschwinden Plasminogen und Plasmin aus dem Blut.

In der zweiten Wirkungsphase sind nur noch Proaktivator und Aktivator im Blut - lytische Aktivität entsteht nur bei Zusatz von Normalplasma. Die zu dieser Zeit entstehenden Thromben sind fibrinolyse refraktär. - Deutsch fand bei seinen Untersuchungen außerdem, daß die verschiedenen SK-Präparate sich in ihrer Wirkung bis zu 400 % unterscheiden können.

2) Die Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin

Die sogenannte spontane Aktivierung wird auf einen spontan auftretenden Aktivator zurückgeführt (98).

Sonst wird das Plasminogen durch die in der ersten Phase entstandenen Aktivatoren in Plasmin umgewandelt.

Am schnellsten läuft die Umwandlung durch Einwirkung des Plasmaaktivators ab: durch SK wird Plasminogen über den Aktivator sehr schnell aktiviert: es finden sich fast keine Unterschiede in der Lysezeit nach Inkubationszeiten von 1 - 10 min (60) und keine Steigerung bei längerer Inkubationszeit (22). - Die direkte Aktivierung des Plasminogens durch Urokinase (UK) geht in 10 - 30 min vor sich (22). Trypsin aktiviert Plasminogen in Abhängigkeit von der Konzentration in 2 - 4 Stunden (128).

Das Ausmaß der Aktivierung soll von der Temperatur und der Menge des Aktivators abhängig sein (52).

Sherry und Alkjaersig (128) behaupten, Plasminogen und Plasmin stünden in vivo in enger Beziehung zu Fibrin und Fibrinogen: bei der Gerinnung sollen große Mengen Plasminogen und auch Proaktivator an das Fibrin adsorbiert werden (11, 41).

Celander und Guest (31) dagegen behaupten, daß nur Plasmin während des Gerinnungsvorganges an das Fibrin adsorbiert wird. Während aktives Plasmin durch Inhibitoren oder Denaturierung im Plasma schnell inaktiviert wird (112), soll es durch Adsorption an Fibrin stabilisiert werden (46).

Back, Ambrus und Markus (16) wiesen mit radioaktiv markierten Substanzen nach, daß UK- und SK-aktiviertes Plasmin bei Hunden an präformierte Gerinnsel adsorbiert wird, während UK und SK selbst auch bei hohen Dosen nicht adsorbiert werden.

Sawyer, Alkjaersig, Fletcher und Sherry (120, 121) stellten demgegenüber fest, daß UK das Plasminogen im Gerinnsel (Gelphase des Plasminogens) schon bei so niedrigen Konzentrationen aktivieren kann, daß es im Plasma noch nicht zu einer nachweisbaren Lyse kam - SK dagegen führte bei niedrigen Dosen nur zu einer Aktivierung des Plasmas (Plasmaphase des Plasminogens).

In hohen Dosen führten dann beide, UK und SK zu einer Aktivierung im Plasma und im Gerinnsel - demnach wäre mit UK eine Thrombolyse ohne, mit SK aber nur eine mit generalisiertem proteolytischen Effekt zu erreichen.

Auch Untersuchungen von v. Kaulla (82) deuten auf eine Adsorbierbarkeit von UK: Präformierte Gerinnsel wurden in einer UK-haltigen, gepufferten NaCl-Lösung inkubiert und anschließend in reine gepufferte NaCl-Lösung gebracht; aus dem Fortgang der Lyse wurde auf eine Adsorption der UK an das Gerinnsel geschlossen.

Alkjaersig, Fletcher und Sherry (6) fanden, daß die Thrombolyse bei UK- und SK-Aktivierung linear abhängig ist von der Aktivatormenge und dem Plasminogengehalt im Gerinnsel.

Nach Beller und Glas (22) steigt bei UK-Aktivierung die fibrinolytische Aktivität mit der Verdünnung des Plasmas infolge der Verdünnung der Inhibitoren, während sie bei SK-Aktivierung abnimmt (Verdünnung der Proaktivatoren).

Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit des fibrinolytischen Systems soll in vitro die Entfernung oder Verminderung von Inhibitoren sein.

Chloroform und andere organische Lösungsmittel sollen Inhibitoren zerstören (91, 115, 129).

Fraktionierung des Plasmas, Ausfällen der Euglobuline kommt einer Beseitigung der Inhibitoren gleich, die mit der überstehenden Flüssigkeit - allerdings unvollständig - entfernt werden (91, 115).

3) Die Spaltung des Fibrins durch Plasmin

Bierstedt (25) sieht in der quantitativ und qualitativ voll ausgebildeten Fibrinfaser das optimale Substrat für das Plasmin. Den Reifungsprozeß des Fibrins bezeichnet er als fibrinolysinrefraktäre Phase; dieser Reifungsprozeß könne verkürzt werden; das Fibrin sei in um so unreiferen Zustand vom Plasmin angreifbar, je stärker das fibrinolytische System aktiviert sei.

Nach Back, Ambrus und Markus (16) ist die Affinität des Plasmins zu Fibrin stärker als zu Antiplasmin - Fibrin kann also Plasmin vom Inhibitor weg an sich reißen; Fibrin soll weiter die Bildung von Plasmin beschleunigen können (115).

Bei der Auflösung eines Gerinnsels werden ein innerer und ein äußerer Lysetyp unterschieden: beim ersteren entsteht das Gerinnsel in schon fibrinolytisch aktivem Plasma (in vitro bei verschiedenen Nachweismethoden). - Beim äußeren Lysetyp finden sich erst nur im Plasma aktive Fibrinolysefaktoren (41, 56).

Der wesentliche Unterschied ist, daß im ersten Falle das aktive Ferment mit in das Gerinnsel eingebaut ist und so auf eine große Oberfläche einwirken kann, während im zweiten Fall das Ferment nur von außen auf das Gerinnsel wirken kann, solange Proaktivator und Plasminogen im Gerinnsel nicht aktiviert sind. Der innere Lysetyp führt schneller zur Lyse.

Fonio (55) hat den Ablauf der Fibrinolyse unter dem Mikroskop untersucht; er konnte die Verflüssigung in einzelne mikroskopisch differenzierbare Phasen unterteilen.

Er fand ausgesprochenere Lyse in plättchenfreiem Plasma als in plättchenreichem Plasma mit einer ausgeprägten Retraktion.

Katshuhiro, Keiji und Toyome (79) stellten mit Hilfe der epsilon-Amino CapronSäure (eACS), mit der sie die Fibrinolyse in jeder Phase stoppen konnten, fest, daß die Fibrinolyse zweiphasig abläuft: zuerst wird das Fibrin in Fibrinopeptide und Metafibrin, dann das Metafibrin weiter in Hydrolysate gespalten. Nach Sherry, Fletcher und Alkjaersig (129) spaltet das Plasmin Fibrin zuerst in mehrere große Polypeptidstücke, indem es wahrscheinlich an Arginin- und Lysinbindungen angreift; die großen Bruchstücke werden dann weiter abgebaut.

Beim Abbau des Fibrins sollen auch Substanzen entstehen, die als Anti-thrombin wirksam sind (41).

4) Änderungen im fibrinolytischen System durch verschiedene Einflüsse

Wie einleitend bemerkt wurde, stellt die Fibrinolyse eine wichtige physiologische Funktion dar, die mit der Funktion des Gerinnungssystems im Gleichgewicht stehen muß. Sie ist ein fermentativer Prozeß, der in vivo durch Inhibitoren geregelt wird (69), wodurch normalerweise der Schutz der anderen Plasmaeiweiße gewährleistet wird.

Der Begriff einer "normalen Fibrinolyse" ist sicher nicht leicht zu fassen, denn einmal differieren die Ergebnisse, die mit ein und derselben Methode bei Gesunden gefunden werden, schon sehr erheblich (69, 147); zum anderen ergeben sich bei der Untersuchung eines Probanden mit mehreren Nachweismethoden je nach Empfindlichkeit der Methode verschiedene Intensitäten der Lyse (82, 139).

Auch beim Gesunden kann natürlicherweise für kurze Zeit eine gesteigerte Lyse auftreten: so sollen starke seelische Erregung, intensive Anstrengung, überhaupt Stresssituationen zu einer vorübergehend gesteigerten Lyse führen (27, 91, 115).

Macfarlane und Biggs (91) und Marx (93) beschreiben eine gesteigerte Lyse nach Adrenalininjektionen und folgern, daß in den genannten Stresssituationen das Adrenalin die gesteigerte Lyse auslöst.

Verschiedene Autoren (27, 30, 67, 48) haben festgestellt, daß die fibrinolytische Aktivität in vivo in 24 Stunden einen gewissen Rhythmus zeigt: nachts soll sie unabhängig von einer Tätigkeit schwächer sein als am Tage (48).

Halse (67) konnte bei einigen Personen unter äußerlich vergleichbaren Umständen auch deutliche Unterschiede von einem Tag zum anderen feststellen.

Bei Untersuchungen der Fibrinolyse nach Fettmahlzeiten (73, 86, 96, 125) ergaben sich keine einheitlichen Ergebnisse.

Ebenso wurde nach Zusatz von Fetten oder fettähnlichen Substanzen einmal Hemmung (63, 94), einmal Steigerung (57, 64) der Lyse gefunden. In der Schwangerschaft soll in den ersten Monaten die Fibrinolyse geringer werden (112), während der Fibrinogenspiegel steigt (59). Sofort nach der Geburt soll dann die fibrinolytische Aktivität für einige Stunden ansteigen (59).

Bei verschiedenen Komplikationen während der Schwangerschaft, wie Abruptio placentae, Fruchtwasserembolie (hoher Proaktivatorgehalt) oder Retention eines toten Feten, kommt es zu einer stark gesteigerten Fibrinolyse. Bei der Abruptio placentae wird die übermäßige Fibrinolyse als Kompensationsversuch gewertet, da die Placenta als thrombokinasereichstes Organ eine latente verstärkte Gerinnung auslösen können soll (85).

Macfarlane (90) stellte schon 1937 nach Operationen eine gesteigerte Lyse fest; später - 1946 - (148) fand er in 50 % der Fälle die Lyse auch kurz vor der Operation schon erhöht (Angst, Medikamente?) - er sah in der Fibrinolysesteigerung einen Teil der Alarmreaktion von Selye.

Bei folgenden Erkrankungen wurde eine verstärkte Fibrinolyse gefunden; bei anaphylaktischem Schock (91), bei immunbiologischen Reaktionen, bei Phosphor- und Chloroformvergiftung (116), bei Lungen- und Pankreaserkrankungen (100), bei intravaskulärer Hämolyse, frischen Thromben und Embolien (115), bei akuter Leukämie (85, 122) und bei Polyzythämie (141). Während i. a. bei Leberkrankheiten, besonders Zirrhosen, eine Steigerung der Fibrinolyse angegeben wird (85, 100, 103, 122), fand Witte (147) die Fibrinolyse bei Leberkranken gegenüber der von Gesunden vermindert.

Eine geringe Erhöhung der Fibrinolyse wird bei Prostatahypertrophie beschrieben (112), eine deutliche Steigerung beim Prostatacarcinom (85) und beim Mammacarcinom (115).

Halse (69) fand bei Thrombosen - bei erheblicher Streuung der Werte - im Mittel keine signifikante Abweichung der SK-aktivierten Lyse von der Norm - er fand aber bei einer Vermehrung des Plasminogens häufig auch eine schnellere Rückbildung der Thrombose.

Lackner und Merskey (87) untersuchten 16 Patienten mit akutem Herzinfarkt mit der "Fearnly-Methode": anfangs war die Lyse für 3 Tage verlangsamt; insgesamt zeigten sich bei den Infarktpatienten viel stärkere Schwankungen in der Lyse als bei gesunden Kontrollpersonen.

Bei Patienten mit Claudicatio intermittens fand Czarniecki (34) eine statisch einwandfreie Verlängerung der SK-aktivierten Vollplasma-Fibrinolyse-

zeit, und Nestel (101) fand mit der Fearnly-Methode eine erniedrigte fibrinolytische Aktivität.

Dicumarolpräparate sollen einen hemmenden Einfluß auf die Fibrinolyse haben, wobei ein Anstieg des Antiplasmins als Ursache vermutet wird (42).

FIBRINOLYTISCHE THERAPIE

Offenbar findet sich also gerade bei stenosierenden und obliterierenden Gefäßprozessen eine verminderte oder wenigstens unzureichende fibrinolytische Aktivität.

Deshalb bemüht man sich heute, eine wirkungsvolle Fibrinolysetherapie für diese Gefäßerkrankungen, besonders auch für akute Gefäßverschlüsse zu entwickeln, die möglichst keine Nebenwirkungen hat (41, 56, 85, 95). Der Erfolg einer solchen Therapie ist vor allem abhängig von dem Alter des Thrombus bzw. des Embolus; nach 3 - 5 Tagen verhindern überwucherndes Endothel bzw. die einsetzende Organisation jeden Einfluß des Plasmins (15).

Es gibt erstens direkte Fibrinolytika: verschiedene Streptokinasepräparate, mehrere Plasmin-Präparate, die sich alle aber trotz gleicher Angabe der Einheitenmengen in der Wirkung höchst unterschiedlich verhalten (41, 56).

Zweitens gibt es indirekte Fibrinolytika, deren Wirkungsmechanismus aber noch weitgehend ungeklärt ist. Versucht wurden Pyrogene (38, 40), Nikotinsäurederivate (41) und das - allerdings umstrittene - Heparin (81, 87, 110).

Nach Deutsch (41) verspricht die Anwendung von Aktivatoren - Streptokinase (SK) - einen größeren therapeutischen Erfolg als die von reinem Plasmin; das Plasmin wird gleich nach der Infusion durch Inhibitoren weitgehend inaktiviert (16), außerdem kann es den Thrombus nur von außen angreifen (6, 14), während SK auch das im Gerinnsel enthaltene Plasminogen bzw. den Proaktivator aktivieren kann, da der Aktivator - durch SK im Plasma gebildet - in das Ge-

rinnsel eindringen kann (35, 41). Heute stehen für die Therapie schon hochgereinigte SK-Präparate zur Verfügung (41). - Da jedoch der Organismus Antikörper gegen die SK - z.B. nach Streptokokkeninfekten - bilden kann, muß vor jeder SK-Therapie der Titer der Antistreptokinase bestimmt werden, damit auch eine genügend hohe SK-Menge verabreicht wird, denn das Gesamtblut eines Menschen soll nach Deutsch (41) zwischen 25 000 und 1 000 000 E SK neutralisieren können.

Die Urokinase (UK) hat zwar weniger und konstantere Antikörper als die SK (41), sie wäre deshalb besser für die Therapie geeignet (66), doch macht die industrielle Herstellung noch Schwierigkeiten.

Wichtig ist bei jeder fibrinolytischen Therapie die Notwendigkeit einer dauernden Kontrolle des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems - zumindest mit Hilfe der Thrombinzeitbestimmung. Außerdem muß anschließend eine Antikoagulantientherapie eingeleitet werden wegen der postfibrinolytischen Thrombophilie (41, 53), zumals die dann gebildeten Thromben fibrinolyse refraktär sind, da sie kein Plasminogen enthalten. Plasmin kann auch die Blutgerinnungsfaktoren - u.a. Fibrinogen - angreifen. Außerdem wird bei der Spaltung des Fibrins eine als Antithrombin wirksame Substanz frei (3, 39, 41).

So zeigt bei der Fibrinolyse therapie das Ansteigen der Thrombinzeit das notwendige Ende der Infusion an. Sonst kann es bei Fortdauer der Fibrinolyse zu schweren Blutungen kommen; als Hauptursache der Blutungen bei gesteigerter Fibrinolyse wird ein Fibrinogenmangel infolge Fibrinogenolyse angesehen (3, 11, 21, 112).

Therapeutisch können gegen eine gefährlich gesteigerte Fibrinolyse epsilon-Aminocapronsäure (eACS), Trasylol oder Soyabohneninhibitor angewendet werden (41, 65).

Unerläßlich für die Erkennung einer pathologisch gesteigerten oder erniedrigten Fibrinolyse sind verlässliche Nachweismethoden - und hier liegt ein entscheidendes Problem!

NACHWEISMETHODEN

Die große Anzahl an Nachweismethoden deutet schon die Schwierigkeiten an, die sich bei dem Versuch ergeben, zu Aussagen über das fibrinolytische Potential einer Testflüssigkeit zu kommen.

Die nun folgende Zusammenstellung in Anlehnung an das bei Villavicencio und Warren (139) gegebene Schema soll einen Überblick über die Prinzipien der heute gebräuchlichen Methoden geben.

- I) Eigenfibrin - Lyse: a) man läßt das Nativblut gleich gerinnen
b) das Zitrat- oder Oxalatblut wird rekalkifiziert oder mit Thrombin versetzt.
- II) Fremdfibrin - Lyse: es wird ein standardisiertes Fibringerinnsel (Rinder- oder Humanfibrinogen + Thrombin) in die Testflüssigkeit gebracht. Dabei kann das Gerinnsel a) im Reagenzglas b) als Fibrinfilm in einer Petrischale (9) oder auf einem Objektträger entstehen (136).
Das Fibrin kann nativ oder auf verschiedene Weise präpariert benutzt werden:
 - a) gefärbt- die Farblösung wird vor der Gerinnung zugesetzt (68)
 - b) erhitzt- um das Plasminogen im Fibrin zu zerstören (88)
 - c) mit radioaktiven Substanzen markiert (121).
- III) Synthetische Substrate, die vom Plasmin angegriffen werden, sind (137):
 - a) Lysinethylester (LEe) - b) Lysinmethylester (LMe) - c) Tryptylargininester (TAMe) und d) Benzoylargininester (BAMe).
- IV) werden Kasein oder Gelatine zum Nachweis einer fibrinolytischen Aktivität verwendet (85, 133).

Als Testlösungen können Vollblut, Plasma oder Serum - aktiviert oder nicht aktiviert - verwandt werden.

Will man die Inhibitoren ausschalten oder vermindern, kann man die Euglobuline ausfällen, die dann weitgehend inhibitorfrei sind - oder die Testflüssigkeit verdünnen (steigende Lyse bei zunehmender Verdünnung des Plasmas mit einem Optimum bei 1 : 20 (27, 133)). Weiter sollen BaSO_4 (140) und Ionenaustauscher (1) Inhibitoren adsorbieren können.

Wird Fibrin als Substrat benutzt, so gibt es grundsätzlich 2 Möglichkeiten, die Fibrinolyse zu messen:

- I) es wird die Zeit gemessen, in der eine bestimmte Menge Substrat völlig gespalten wird (Totallyse).
- II) es wird die Menge des Substrates bestimmt, die in einer bestimmten Zeit gespalten wird. Hier braucht dann die oft erst sehr spät eintretende Totallyse nicht abgewartet zu werden. - Es wurden nun verschiedene Methoden entwickelt, die "Fibrinmenge" vor und nach der Plasminwirkung zu messen:
 - 1) indirekte Fibrinmessung
 - a) colorimetrische Bestimmung des im Gerinnsel verbliebenen Farbstoffes (68) oder des Hämoglobins der Erythrozyten im Gerinnsel (27).
 - b) das Gerinnsel wird von einer Spezialkamera in bestimmten Zeitabständen automatisch photographiert (50).
 - 2) direkte Fibrinmessung
 - a) kjeldahlometrische Stickstoffbestimmung des Gerinnsels (69, 70).
 - b) colorimetrische Bestimmung des Tyrosinäquivalentes des Fibrins (83)
 - c) nephelometrische Fibrinbestimmung (78): in stark verdünntem plättchen-freien Plasma (Zitratplasma) wird der Fibringehalt nephelometrisch vorher und nach 6, 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bestimmt.

Fast alle hier angeführten Methoden sind bei Stamm (133) ausführlich beschrieben.

Jetzt soll noch in Anlehnung an Stamm (133) eine Zusammenstellung gegeben werden, in der die verschiedenen Methoden nach ihrer Eignung zur Bestimmung der einzelnen Fibrinolysefaktoren geordnet sind:

- A) Messung der Proaktivator/ Plasminogen -Aktivität = Profibrinolysezeit.
 - 1) Reagenzglas-methode mit bovinem Nativfibrin

Marbet 1956 (92): SK -aktiviertes Plasma und Stoppung der Lysezeit bei Absinken des auf das Gerinnsel gestreuten Seesandes

Witte und Dirnberger 1954 (146): Euglobulinfibrinolyse
 - 2) Fibrinplatten-methode mit bovinem Nativfibrin

Astrup und Müllertz 1952 (9)

In eine dünne Fibrinschicht in einer Petrischale wird ein rundes Loch gestanzt, das die Testlösung aufnimmt. Nach bestimmten Zeiten wird die Größe der Lysehöfe gemessen.
- B) Messung des Plasminogens
 - 1) Fibrinplatten mit bovinem Hitzefibrin

Lassen 1952 (88): in den Fibrinplatten wird das Plasminogen durch Hitze denaturiert - "Aktivitätsverlust" bis zu 90 % gegenüber Normalplatten.

2) Kasein als Testsubstrat

Remmert u. Cohen 1959 (117)

Elsner 1957 (45): 1ml Testlösung wird mit einer Kaseinlösung versetzt, so daß das endgültige Gemisch 4 % Kasein enthält. Es wird vor und nach der Inkubation das freie Tyrosin bestimmt - Zunahme des freien Tyrosins als Maß für die Fibrinolyse.

3) Synthetische Substrate

Troll, Sherry, Wachmann 1959 (137)

sehr komplizierte Methode (siehe Stamm (133)).

C) Messung der Euglobulinfibrinolyse

1) die Euglobulinlösung wird durch Zusatz von Thrombin oder CaCl_2 zur Gerinnung gebracht.

a) Makromethode: v. Kaulla 1958 (150): die Zeit bis zur totalen Auflösung des Gerinnsels wird gemessen

b) Mikromethode: Copley, Niewiarowski, Marechal 1959 (33) entsprechend der Makromethode; mit 0,05 ml!

2) auf Fibrinplatten mit bovinem Hitzefibrin

Lassen 1952 s.o. hier jedoch SK-Aktivierung

3) mit Kasein Elsner 1957 s.o. SK-Aktivierung

4) mit TAME Höder und Kickhöfen 1957 (72)

D) Messung der Plasmin- und Aktivator-Aktivität (Fibrinolysinzeit)

1) Reagenzglasmethode mit bovinem Nativfibrin

Marbet 1956 s.o. hier erfolgt jedoch keine Aktivierung, die Zeit bis zur Lyse wird gestoppt.

Normalblut: keine Lyse

Johnson und Seegers 1953 (149)

Es wird die Zeit bis zur totalen Lyse eines aus gereinigtem Rinderfibrinogen und Thrombin hergestellten Gerinnsels gemessen.

2) Fibrinplattenmethode mit bovinem Nativfibrin

Astrup und Müllertz 1952 s.o.

Jürgens und Beller 1959 (77) Modifikation.

E) Messung des Plasmins (Fibrinolysins)

Die Substrate müssen hier unbedingt plasminogen- und plasminfrei sein!

1) Fibrinplatten mit bovinem Hitzefibrin

Lassen 1952 s.o.; Jürgens und Beller 1959 s.o.

2) Synthetische Substrate: LEE, LMe, BAME, TAME

Troll, Sherry und Wachmann s.o.

F) Spontanfibrinolyse

1) Reagenzglasmethode

Eichenberger (aus Stamm 133)

Plasma wird durch Rekalkifizierung oder Thrombinzusatz zur Gerinnung gebracht, dann wird bei 37° C die Zeit bis zur Totallyse gemessen - bei Rekalkifizierung erfolgt eine langsamere Lyse

2) Messung mit dem Thrombelastographen (TEG)

Hartert 1951 (71)

3) Hämagglutinationsmethode

Dausset, Bergerot-Blondel und Collin 1956 (36)

Mit Tannin behandelte Erythrozyten werden durch unbekannte Stoffe, die bei der Fibrinolyse frei werden, agglutiniert. Mit dieser Methode können äußerst schwache, sonst mit keiner Methode feststellbare Lysen nachgewiesen werden.

G) Antiplasminbestimmung

- 1) Marbet 1956 (92): die SK-aktivierte Euglobulinfraktion eines Normalplasmas wird in einer Verdünnungsreihe mit der Lösung versetzt, die Antiplasmin enthalten soll. Die Ausgangsaktivität der unverdünnten Globulinfraktion wird als 100 % Lyse= keine Hemmung angesehen. Die Restaktivität nach Zusatz der Testlösung, die 30min bei 37° C einwirkt, gibt die Hemmung an; nach den 30min Inkubation werden Rinderplasma und Thrombin zum Ansatz gegeben und die Lysezeit gestoppt.

2) Beller und Reinhardt 1959 (20)

Plasma wird mit SK optimal aktiviert, 3 Röhrchen werden für 1 min bei 37° C inkubiert, dann wird in 2 Röhrchen physiologische NaCl-Lösung gegeben, der 3. Ansatz bleibt unverdünnt. - Beim ersten Röhrchen wird die Lysezeit sofort bestimmt, Ansatz 2 und 3 bleiben 30min im Wasserbad bei 37° C, dann wird auch Ansatz 3 verdünnt und bei 2 und 3 wird die Lysezeit bestimmt; die Lysezeit von Ansatz 1 ist der Leerwert, die von Ansatz 3 der Hauptwert und die von Ansatz 2 der Wert für Inhibitoren, die durch Verdünnung nicht beeinflusst werden. Im Normalblut sollen in 30min 60 % des streptokinaseaktivierten Plasmins durch Antiplasmin gehemmt werden.

H) Bestimmung der Antistreptokinase

Die Antistreptokinase (ASK)-Titer schwanken beim Menschen sehr stark (41) - ihre genaue Ermittlung spielt bei der Fibrinolysetherapie eine große Rolle.

Es sind verschiedene ASK-Nachweismethoden angegeben worden (39, 41 53, 54, 65), auf die hier nicht im einzelnen eingegangen werden soll. Das

Prinzip ist, von einer SK-Verdünnungsreihe den Aktivierungserfolg auf Zitratplasma oder -blut nach einer bestimmten Zeit abzulesen oder die Zeit bis zur Totallyse im Ansatz bei verschiedenen SK-Konzentrationen zu bestimmen. Ausführliche Darstellung der Methode nach Fletcher (aus 39) im experimentellen Teil.

Gross (65) sieht jedoch in diesen SK-Resistenz- oder -Toleranztesten einen Nachweis der Gesamthemmung - (ASK + Antiplasmin), wobei der Test die für die Dosierung (Therapie) interessierende Situation in vivo nur sehr bedingt nachahmt.

Jedenfalls muß der ASK-Titer bei allen Methoden berücksichtigt werden, bei denen mit SK aktiviert wird.

J) Messung der fibrinolytischen Blutaktivität durch die Antithrombinbestimmung

Innerfield, Shub und Boyd 1958 (74)

Die Autoren haben regelmäßig bei fibrinolytischer Blutaktivität einen erhöhten Antithrombintiter im Blut gefunden. Sie sind daher der Ansicht, daß die Messung der Antithrombinzeit (Thrombinzeit) eine empfindliche Methode der Fibrinolysebestimmung sei.

Schröer und Merz (124) glauben, daß eine gesteigerte Thrombinaktivität stets auch eine Intensivierung der Blutfibrinolyse nach sich ziehe.

Diese Übersicht zeigt, daß es offenbar Schwierigkeiten macht, eine einfache standardisierte quantitative Nachweismethode für die Fibrinolyse zu entwickeln.

Weitere z.T. ungeklärte Schwierigkeiten bieten die im folgenden aufgeführten Einflüsse, die schon bei der 1) Blutabnahme, 2) Aufbewahrung und 3) der Weiterverarbeitung wie Verdünnung etc. möglicherweise das spätere Lyseergebnis verändern können:

So wurde festgestellt, daß der Staudruck bei der Blutabnahme die Lyse in dem Testblut gegenüber dem aus nicht gestauten Venen gewonnenen Blut deutlich erhöht (27, 93), wobei ein dem mittleren Blutdruck entsprechender Druck am wirksamsten sein soll. Dem Blut wird i. a. nach der Abnahme Zitrat oder Oxalat zugesetzt, um die Gerinnung zu unterbinden.

Astrup (13) und Buckell (28) fanden nun, daß Zitratplasma auf Fibrinplatten zu höheren Lyseergebnissen führt als Oxalat- oder Nativ-Plasma; sie glauben, daß die Überführung des Proaktivators in den Aktivator begünstigt wird. - Andere Forscher (27, 56, 69, 140) erzielten dagegen mit Nativ-, Zitrat- und Oxalatplasma oder -blut keine Lyseunterschiede.

Oft werden Blut oder Plasma in verdünntem Zustand getestet; dabei wird neben dem Verdünnungseffekt (22, 115) vor allem auch dem Ionengehalt eine Bedeutung zugemessen: so fand Sherry (127) die Plasminfibrinolyse bei Zusatz von

Phosphatpuffer(0,025m) gesteigert. - Weiner (145) erhielt bei Zusatz von hyper-tonen Phosphat - und NaCl-Lösungen vollständige Lysen, Buckell (29) dagegen bei zunehmender Salzkonzentration (0 - 1 %) abnehmende Lysequoten. Zentrifugieren soll die fibrinolytische Aktivität des Plasmas unberührt lassen (91), ebenso die Beseitigung von Calcium und Thrombozyten (134).

Die Temperatur bei der Aufbewahrung des Blutes oder Plasmas ist offenbar je nach Aktivierungsmechanismus von unterschiedlicher Bedeutung. So soll die spontane Aktivität des Blutes bei Zimmertemperatur schnell verloren gehen (47, 51), während die fibrinolytische Aktivität von pepton- oder nikotinsäure-amidaktiviertem Plasma bei Zimmertemperatur für mehrere Stunden gleich bleibt (110, 145).

Schröer und Merz (124) fanden eine schneller ablaufende Lyse, wenn sie das Blut in einfachem Glas auffingen als wenn sie silikonisiertes Glas benutzten.

Beim Testansatz schließlich sind einige Punkte zu beachten. Marx (93) stellte fest, daß die Kontaktfläche Serum/Luft von Bedeutung ist; er fand, daß Sauerstoff ebenso wie CO_2 -freie Luft die Fibrinolyse begünstigen.

Weiter ist der pH -Wert im Testansatz von Bedeutung (47): bei konstantem pH soll die Lysezeit eine lineare Funktion der Plasmakonzentration sein. In vitro läßt sich der pH -Wert aber nur konstant erhalten, wenn das Plasma mit Puffer (pH 7,4) verdünnt wird; bei Vollplasma wird der pH -Wert infolge des CO_2 -Verlustes alkalischer - bis pH 9,3 (47).

Außerdem soll 1 : 10 verdünntes Plasma bei den pH -Werten 7,4 und 8,6 zwei Spitzen in der Aktivität zeigen: bei rekalkifiziertem Gerinnsel wird die höhere Lyse bei 8,6, bei "Thrombingerinnseln" bei 7,4 erreicht.

Von weiterer Bedeutung soll die Art der Bildung des als Testsubstrat verwendeten Gerinnsels sein. Dabei ist es gleich, ob a) das Fibrinogen des Probanden oder b) ein käufliches Fibrinogenpräparat zur Gerinnung gebracht wird.

Mehrere Untersucher (13, 124, 146) erhielten bei steigenden Thrombinmengen und damit beschleunigter Gerinnung auch eine schneller ablaufende Lyse. - Wurde dagegen die Gerinnselbildung auf 5 min verlängert, so soll sich ohne Einfluß der Inkubationstemperatur die Lysezeit verlängert haben.

Bickford und Sokolow (23) konnten zeigen, daß ohne fibrinstabilisierenden Faktor und Calcium gebildetes Fibrin in Harnstoff löslich ist und nach Dialyse wieder gerinnt - es besitzt im wesentlichen Wasserstoffbrücken. - Dagegen löst sich in Anwesenheit von Calcium gebildetes Fibrin nicht in Harnstoff - es besitzt vorwiegend Sulfhydrylbrücken - und zeigt auch eine schwächere Lysierbarkeit.

Einleuchtend ist die Beobachtung von Sherry und Alkjaersig (128), daß die Vergrößerung der Kontaktflächen Serum/Gerinnsel die Lysequote erhöht.

Zu beachten ist, daß Fibrinogenpräparate mit Plasminogen und anderen fibrino-

lytischen Faktoren verunreinigt sein können - bovine i. a. stärker als humane (127, 129), doch geben Bickford und Sokolow (23) gleiche Ergebnisse mit Human- und Rinderfibrinogen an (Spontanlyse und SK-aktivierte Lyse).

Das Plasminogen im Fibrin kann jedoch, um Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden, durch Erhitzung auf 90° C für 30 - 45 min zerstört werden. - Dabei soll nach Lassen (88) die Struktur des Fibrins nicht verändert werden, so daß es zum Fibrinolyse nachweis vollwertig bleibt. - Deutsch (37) und Stamm (133) fanden dagegen nach Erhitzung eine Abnahme der Empfindlichkeit des Fibrins gegenüber Fermenten, die sie auf die Denaturierung zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit soll die in der Medizinischen Poliklinik der Universität München inaugurierte Methode des quantitativen Nachweises fibrinolytischer Aktivität - die sogenannte Papierfibrinolyse - in ihren einzelnen Arbeitsgängen weiter standardisiert und teilweise modifiziert werden sowie klinisch als neue Fibrinolyse nachweismethode geprüft werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Verwendete Materialien

- 1) Natriumzitat 3,8 %ig, neutral - Klinikapotheke
- 2) Isotonische sterile NaCl-Lösung 0,9 %ig, p_H 5,5 - 6
- 3) Veronalpuffer p_H 7,3 (0,05m) - Klinikapotheke
- 4) Aqua bidestillata (- Ampuwa - Dr. E. Fresenius)
- 5) Streptokinase: Varidase (Lederle) 20 000 E pro Ampulle (die 5 000 E Streptodornase bleiben unberücksichtigt bei den Verdünnungen).
Streptase (Behring) 5 000 E pro Ampulle
- 6) Rinderfibrinogen (Behring): Ampullen zu 60 mg
- 7) Test-Thrombin (Behring): 60 NIH Einheiten pro Ampulle
- 8) epsilon-Aminocapronsäure ("Roche"): 5 ml mit 400 mg/ml
- 9) Chromatography Paper: Whatman No I gerichtet: 28,5 x 3,9 cm
- 10) Amidoschwarz 10B (Bayer)
- 11) Elphorentfärber: 100 ml Eisessig + 900 ml Methanol (Klinikapotheke)
- 12) Elphor-Transparenzflüssigkeit - Klinikapotheke

Geräte:

- 1) Auswertegerät "Elphor Integrator"
und Vakuumpumpe (Bender & Hobein)
- 2) Bechergläser 250 ml - weit
- 3) Objektträgerpinzetten
- 4) Hartgummirolle (Linolaufrückwalze) 203,5 Gramm schwer
- 5) Exsiccator mit $CaCl_2$.

METHODE

Prinzip: Zitratblut (1 : 10) wird zentrifugiert (10 min bei 3 000 rpm), das Plasma wird abgehebert, mit Puffer (p_H 7,3) verdünnt und mit Streptokinase (SK) aktiviert. Dieses verdünnte und aktivierte Plasma wird dann mit Rinderfibrin, das in dünner Schicht an normales Elektrophoresepapier adsorbiert ist, auf seine fibrinolytische Aktivität untersucht. - Entsprechend der Stärke der Aktivität (die auch durch verschiedene Mengen von Streptokinase und/oder Verdünnungsflüssigkeit variiert werden kann) wird das Fibrin aus dem Papier gelöst

Die Anfärbung des so inkubierten und in bestimmter Weise gewässerten und getrockneten Papiers mit Amidoschwarz 10 B und die anschließende photometrische Auswertung ermöglichen quantitative Aussagen über das gelöste Fibrin in Prozent zu machen. Im folgenden sollen die Arbeitsgänge im einzelnen beschrieben werden. Diese lassen sich gliedern in:

- I) Herstellung der Fibrinpapierfolie
- II) Testansatz: a) Inkubation der Fibrinpapierfolie in dem mit SK aktivierten Probandenplasma
b) Weiterbehandlung mit isotonischer NaCl-Lösung (der inkubierten Fibrinpapierfolie)
- III) Auswertung: a) Färbung der getesteten Folien
b) photometrische Auswertung

I) HERSTELLUNG DER FIBRINPAPIERFOLIE

Prinzip: Elphorpapierstreifen werden zuerst mit Fibrinogenlösung getränkt, dann luftgetrocknet, anschließend mit Thrombinlösung versetzt, erneut luftgetrocknet, anschließend bis zur Verwendung im Testansatz im Exsiccator aufbewahrt.

Ansetzen der Fibrinogenlösung: Es wird eine 0,3 %ige Fibrinogenlösung (Rinderfibrinogen Behring) hergestellt: das Fibrinogen wird in isotonischer NaCl-Lösung aufgelöst!

Normalerweise stellen wir 80 - 100 ml Lösung her (240 - 300 mg Fibrinogen), mit der wir 20 - 30 Streifen des Elphorpapiers tränken können.

Die Lösung wird dann noch gefiltert (Rundfilter), um kleine Paraffinbröckel von Stopfen des Präparateglases und minimale, nicht gelöste Reste von Fibrinogen zu beseitigen.

Wir wählten eine 0,3 %ige Fibrinogenlösung, weil die gefärbten Fibrinpapierstreifen dann in dem optimalen Bereich unseres Auswertegerätes liegen.

Wir bekamen bei geringeren Fibrinogenkonzentrationen (0,1 - 0,2 %) nach der Inkubation im aktivierten Plasma nicht mehr so klar differente Lysewerte.

Bei stärkeren Konzentrationen (0,4 - 0,6 %) kamen wir an die Grenze (0,4 %) des Auswertebereiches oder überschritten diesen schon erheblich (0,6 %), die gefärbten Streifen waren dann tiefschwarz und der Auswertegerät konnte die Spanne von gefärbtem Papier ohne Fibrin bis zum gefärbten Papier mit Fibrin (ohne Lyse) nicht erfassen.

Tränkung der Papierstreifen mit Fibrinogenlösung: Die Fibrinogenlösung befindet sich in einer Glasdose, die gerade so weit ist, daß der Streifen (3,9 cm breit) leicht durch die Lösung gezogen werden kann, die aber auch noch bei den letzten Streifen (wenig Flüssigkeit!) eine ausreichende Eintauchtiefe garantiert (sparsames Arbeiten).

Die Tränkung erfolgt durch zügiges (!) Durchziehen des Streifens durch die Lösung - die Streifen werden dabei mit Objektträgerpinzetten gehalten.

Wird der Streifen nicht zügig durchgezogen, entsteht an Stellen, wo vor dem Weiterziehen durch die Kapillarkraft im Papier Lösung in den noch trockenen Teil gesaugt wird, bei der Färbung ein hellerer Querstreifen, der bei der Auswertung zu Ungenauigkeiten führt.

Beim Vergleich der ersten durchgezogenen Streifen mit den letzten durchgezogenen Papierstreifen zeigen sich nach der photometrischen Auswertung keine Unterschiede in der Fibrinogenaufnahme des Papieres, d.h., daß die Fibrinogenlösung im Verlaufe der Tränkung mehrerer Streifen offenbar keine Konzentrationsänderung erfährt.

"Ausrollung" der überstehenden Flüssigkeit: Nach zweimaligem Durchziehen durch die Lösung werden die Papierstreifen auf eine Glasscheibe gelegt und bei einer Neigung der Scheibe von ungefähr 35 Grad die reichlich überstehende Flüssigkeit mit einer Hartgummirolle (203,5 gr) durch zweimaliges Überrollen von oben nach unten beseitigt. Das Überrollen erfolgt langsam und ohne zusätzlichen Druck, so daß die Präparation weitgehend gleichmäßig und schonend für das Papier verläuft. Scheibe und Rolle werden nach jedem Ausrollen trockengewischt.

Dieses Ausrollen führt zu einer gleichmäßigeren Verteilung des Fibrinogens innerhalb des Streifens und ist schonender für das Papier als das frühere Abstreichen über ein weitlumiges Reagenzglas (Müller, 96).

Nach dem "Ausrollen" werden die Streifen horizontal über die Ränder eines großen leeren Wasserbades straff aufgespannt, so daß die Flüssigkeit sich nicht, wie z.B. bei vertikaler Aufhängung des Streifens, der Schwerkraft folgend an der tiefsten Stelle sammeln kann.

Nach einstündiger "Zwischentrocknung" werden die Streifen dann mit Thrombin getränkt. - Die Trocknung erfolgt an der Luft bei Zimmertemperatur.

Die Zwischentrocknung scheint einen Einfluß auf die Fixierung des Fibrinogens an die Papierfaser, vielleicht aber auch auf die spätere Fibrinbildung zu haben. - Werden die fibrinogengetränkten Streifen nämlich noch leicht feucht der anschließenden Thrombinträn-

kung unterzogen, so sind sie im Testansatz etwas empfindlicher als Streifen mit Zwischentrocknung. Der Nachteil bei der Weiterverarbeitung der noch feuchten Fibrinogenpapierstreifen aber ist die Bildung feinsten Fibringerinnsel in der Thrombinlösung - diese Gerinnsel kommen mit auf das Papier und verursachen dann eine nach der Färbung sichtbare unregelmäßige körnige Fleckung auf dem Papier, welche die Auswertung stört.

Die Thrombintränkung:

Thrombinlösung: 1 Ampulle Test-Thrombin (Behring) zu 60 NIH E wird in 6 ml Aqua bidest. (Ampuwa) aufgelöst. Wir stellen stets eine der Menge der Fibrinogenlösung entsprechende Menge Thrombinlösung her (80 bis 100 ml zu 10 E/ml).

Die Tränkung der trockenen fibrinogengetränkten Streifen ist durch die schlechte Benetzbarkeit etwas erschwert. Es wird im Prinzip genau so verfahren, wie bei der Fibrinogenetränkung.

Wir bestimmten mit unseren Thrombinlösungen an Normalplasmen die Thrombinzeit und fanden, daß die Aktivität der Lösung im Laufe der Tränkung von mehreren - 20 - Streifen abnimmt. Das führt aber nicht dazu, daß später durchgezogene Streifen eine andere - niedrigere oder höhere - Empfindlichkeit im Testansatz zeigen als früher durchgezogene Streifen, da bei den verwendeten Thrombineinheiten das Thrombin zu Beginn der Tränkung der Streifen mit diesem erheblich im Überschuß vorhanden ist.

Das Papier wird nach der Thrombintränkung wieder über das Wasserbad gespannt und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Die trockenen Papierstreifen werden dann in einem Exsiccator (CaCl_2) bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Zwischen Papierherstellung und -verwendung liegen stets mindestens 24 Stunden Aufbewahrung im Exsiccator. - Das Fibrinpapier läßt sich auf diese Weise mindestens 1 Monat ohne Empfindlichkeitsverlust aufbewahren. Es zeigen sich prinzipiell bei der Anfärbung Unterschiede zwischen den einzelnen Streifen einer Serie bei jeweils gleichem Herstellungsmodus. Dies dürfte auf unterschiedliche Fibrinmengen im Papier zurückzuführen sein, denn die Aufnahme von Amidoschwarz 10B soll in weiten Bereichen der Eiweißkonzentration im Papier proportional sein (61). - Diese Unterschiede treten unabhängig von der Reihenfolge bei der Fibrinogen- und Thrombintränkung auf.

Uns fiel auf, daß einige der unbehandelten Papierstreifen dicker und fester erschienen als andere.

Eine vergleichende Wägung solcher "Leerpapiere" ergab nach Exsiccatorrock-

nung ein durchschnittliches Gewicht von 959,9 mg für einen Streifen und Unterschiede zwischen den einzelnen Streifen bis zu 78 mg = $\pm 4\%$.

Inwieweit diese geringen Gewichtsunterschiede der Papierstreifen für die verschiedenen Anfärbungsintensitäten = Fibrinmengen verantwortlich sind, wurde nicht weiter untersucht.

Die Relativprozente der Lyse, die mit verschiedenen Streifen in verschiedenen Testansätzen vom selben Plasma gewonnen werden, sind trotz dieser Unterschiede von Streifen zu Streifen numerisch weitgehend gleich.

Wir wollten feststellen, wieviel Fibrinogen bzw. Fibrin ein Streifen (28,5 x 3,9 cm) im Durchschnitt aufnimmt, und stellten von jeweils 10 Streifen nach Trocknung im evakuierten Exsiccator folgende Durchschnittsgewichte fest:

- | | |
|---|------------|
| 1) leere Papierstreifen | 959,9 mg |
| 2) mit 0,9 %iger NaCl-Lösung getränkte Papierstreifen | 999,9 mg |
| 3) mit 0,3 %iger Fibrinogenlösung getränkte Streifen
(Fibrinogen in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst!) | 1 014,5 mg |
| 4) die fibrinogenhaltigen Streifen nach Tränkung in
Thrombinlösung (10E Thrombin/ml aqua bidest.) | 1 001,0 mg |

Es werden mit 60 ml Fibrinogenlösung (180 mg Fibrinogen = 0,3 %ige Lösung) 20 Streifen getränkt. - Maximal könnte also bei vollkommen gleicher Verteilung ein Streifen 9 mg Fibrinogen aufnehmen. Nach der Tränkung in 0,9 %iger NaCl-Lösung wird ein Streifen um durchschnittlich 40 mg schwerer, nach der Tränkung in 0,3 %iger Fibrinogenlösung (Lösungsmittel 0,9 %ige NaCl) wird ein Streifen um 54,6 mg schwerer. Der Unterschied von 14,6 mg kann nicht allein durch das Fibrinogen bedingt sein (s.o.), es wird also offenbar durch Vermittlung des Eiweißkörpers Fibrinogen mehr NaCl in das Papier aufgenommen.

Wir nehmen an, daß das Fibrinogen sich bei der folgenden Trocknung eng an die Papierfaser anlagert und der Gewichtsverlust des Streifens von 13,5 mg bei der anschließenden Thrombintränkung darauf beruht, daß ein Teil des NaCl in die mit aqua bidest. angesetzte Thrombinlösung übergeht.

Eine sichere Aussage über die aufgenommene Fibrinogenmenge läßt sich aus diesen Ergebnissen nicht machen.

Für die einzelnen Ansätze werden aus dem mittleren Teil eines Streifens sechs 3 cm breite Stücke (Fibrinpapierfolie) geschnitten, so daß an beiden Enden des Streifens ein genügend breiter Rand, der z.T. infolge der Manipulationen bei den Präparationen nicht mehr ganz einwandfrei ist, verworfen werden kann. Die 3 cm breiten Stücke werden im folgenden als Fibrinpapier(folien) bezeichnet.

II) TESTANSATZ

a) Inkubation

Müller (96) benutzte ursprünglich folgenden Ansatz:

3,5 ml Zitratplasma (aus Zitratblut 1 : 10, das 10 min bei 3 000 rpm zentrifugiert wurde) wurden mit 15 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und dann mit 3,5 ml Streptokinase 10 E/ml (Varidase "Lederle" in isotonischer NaCl) aktiviert. Dann wurde die Fibrinpapierfolie für 15 min bei Zimmertemperatur in diesem Ansatz inkubiert, dann in strömendem Leitungswasser 30 min gespült und schließlich noch 22 Stunden in 0,9 %iger NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur "gewässert". Dieser Ansatz wurde in einigen Punkten abgeändert:

- 1) Die Plasamenge wurde auf 1,5 ml verringert, da von den insgesamt 20 ml Zitratblut eines Probanden nur 10 ml Zitratplasma gewonnen werden konnten, das auch noch für einige weitere Untersuchungen benötigt wurde.
- 2) Es wurde statt der isotonischen NaCl-Lösung Veronälpuffer (p_H 7,3) benutzt, weil die NaCl-Lösung mit einem p_H von 5,5 bis 6,0 weit außerhalb des physiologischen und optimalen p_H -Bereiches für die Fibrinolyse liegt.
- 3) Die Verdünnung des Zitratplasmas im Ansatz wurde von 1 : 6,3 auf 1 : 12 erhöht, denn zum völligen Eintauchen der Fibrinpapierfolie ist in den Bechergläsern eine Menge von mindestens 15 ml erforderlich (bei 1,5 ml Plasma). Außerdem scheint nach den Ergebnissen aus Verdünnungsreihen einiger Plasmen die größte Differenz der lytischen Aktivität dieser Plasmen in dem Verdünnungsbereich von 1 : 8 bis 1 : 16 zu liegen.
- 4) Die Streptokinasemenge wurde erhöht:

Wir gingen außerdem von der Varidase (Lederle), die ja auch noch Streptodornase enthält, auf das reine Streptokinasepräparat Streptase (Behring) über, das bei gleicher Einheitenmenge jeweils etwas höhere Lysequoten erreicht.

Während wir früher 10E Varidase pro ml Plasma benutzten, aktivieren wir jetzt mit 50E Streptase pro ml Plasma. Sowohl mit Varidase wie mit Streptase ließen sich bei der Aktivierung mit 10E/ml Plasma in einzelnen Fällen keine Lysen erzielen, ja die inkubierte Fibrinpapierfolie zeigte sogar eine Extinktionszunahme. Diese sogenannten "negativen Lysewerte" konnten durch Erhöhung der Streptokinasemenge auf 50E/ml Plasma vermieden werden; das ergab zwar eine prinzipiell etwas höhere Lysequote (nachgewiesen an gepooltem Normalplasma), die Relation der Lyseergebnisse bei Vergleich verschieden aktiver Plasmen wurde durch die höhere Streptokinasekonzentration jedoch nicht grundlegend verändert. Es wurde somit die neue Streptokinase (SK)-Konzentration dann prinzipiell beibehalten.

Die "negativen Lysewerte" zeigten beim Vergleich mit nicht inkubierten Fibrinpapierfolien vom gleichen Streifen erheblich höhere Extinktionswerte als diese Werte, die deutlich außerhalb der Fehlerbreite der Methode liegen. Diese vermehrte Aufnahme von Farbstoff ist nur durch einen erhöhten Gehalt an Eiweißkörpern im Papier zu erklären, also z.B. durch Adsorption von Plasmaproteinen. - Vielleicht wirken Streptokinase (SK) oder irgendwelche Zwischenprodukte bei geringem SK-Zusatz als Adsorptionskatalysatoren, was bei einigen Plasmen die paradoxe Adsorption von Plasmaproteinen an die Fibrinfolie bei schwacher SK-Aktivierung erklären könnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß auf eine ähnliche Weise die Eluierbarkeit der Plasmaproteine bei der nachfolgenden Wässerung in 0,9 %iger NaCl-Lösung partiell inhibiert wird, weil vielleicht die lyophile Phase des Fibrinogens des Plasmas im Testansatz beeinflusst wird.

Unser derzeitiger Standardansatz sieht also wie folgt aus: 1,5 ml Zitratplasma werden mit 15 ml Veronalpuffer (p_H 7,3) verdünnt und dann mit 1,5 ml SK (Streptase "Behring" - 50 E/ml) aktiviert.

Durchführung: es wurden stets Doppelbestimmungen gemacht.

Zuerst werden 15 ml Pufferlösung in die Bechergläser gefüllt, dann die 1,5 ml Zitratplasma dazupipettiert und zuletzt 1,5 ml der SK-Lösung dazugegeben (Streptase in isotonischer NaCl gelöst - Stammlösung 1 000 E/ml, 2 Tage bei 5° C haltbar - Gebrauchslösung 50 E/ml oder andere Mengen).

Wir stellten informativ fest, daß die Aktivierung des verdünnten Plasmas z.T. zu höheren Lyseergebnissen führt als die Aktivierung des unverdünnten Plasmas mit anschließender Verdünnung.

Die 3 Bestandteile des Ansatzes werden durch vorsichtiges Schwenken des Becherglases gut gemischt. Dann wird, um bei dieser SK-Menge optimale Aktivierung des fibrinolytischen Potentials zu erreichen das Inkubationsgemisch 5 min bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Anschließend wird zu jedem Ansatz eine Fibrinpapierfolie gegeben, die sich zwar schnell mit der Inkubationsflüssigkeit vollsaugt, aber doch weiter an der Oberfläche schwimmen bleibt. Durch zweimaliges Wenden der Fibrinpapierfolie mit einer Objektträgerpinzette (eine pro Doppelansatz) und vorsichtiges Entfernen eventuell vorhandener Luftbläschen am Papier läßt sich eine gleichmäßige Durchtränkung erzielen, so daß das Fibrinpapier unter der Oberfläche der Plasmaverdünnung bleibt. Somit ist eine gleichmäßige Einwirkung der SK-aktivierten Plasmaverdünnung auf die Fibrinpapierfolie gewährleistet. Nach 15 min Inkubation bei Zimmertemperatur werden die Folien aus den Ansätzen genommen. Diese Inkubationszeit wurde gewählt, da nach den Untersuchungen von Müller (96) bei einer Inkubation über diese Zeit hinaus bis zu 30 min keine erfaßbare Steigerung der Lysequote eintritt.

b) Wässerung

Nach der Inkubation werden die Fibrinpapierfolien 15 min in einem Wasserbad mit leicht bewegtem, durchfließendem Leitungswasser gespült, um bei dieser "Vorwässerung" schon einen Teil der dem Papier noch anhaftenden Plasmaproteine zu entfernen.

Nach dieser Vorwässerung kommen die Fibrinpapiere nach Doppelansätzen getrennt für 20 - 22 Stunden in isotonische NaCl-Lösung in mit Parafilm verschlossenen Bechergläsern. Grundsätzlich werden nach dieser 22-stündigen Wässerung bei Zimmertemperatur die Folien zwischen Zellstofflagen wiederum bei Zimmertemperatur getrocknet.

Nach dieser Trocknung (die Papiere bleiben 20 - 24 Stunden zwischen den Zellstofflagen), erfolgt die Färbung mit Amidoschwarz.

III) AUSWERTUNG

a) Färbung

Farbstoffwahl: wir wählten Amidoschwarz 10B (Bayer) als Farbstoff wie bei der Papierelektrophorese, weil es nach Graßmann und Hannig (61) eine hinlänglich hohe und in weiten Bereichen der Eiweißkonzentration proportionale Anfärbung liefert und sich von allen bisher untersuchten Farbstoffen in diesen Beziehungen als der beste erwiesen haben soll.

Durchführung der Färbung: Die lufttrockenen Fibrinpapierfolien werden in einem kleinen Wasserbad 10 min mit Amidoschwarz gefärbt. Die Farblösung wird dann abgegossen und die Folien mit Elphorentfärber (Methanol und Eisessig) in 9 Stufen abnehmender Konzentration von Amidoschwarz für jeweils 10 min pro Stufe ausdifferenziert. - Die letzte Stufe ist farbloser Elphorentfärber. Die Lösung muß klar bleiben, darf also praktisch keinen Farbstoff mehr enthalten, wenn nach 10 min die Folien herausgenommen werden.

Während der Färbung und Entfärbung werden die Papiere wiederholt mit einer Objektträgerpinzette gewendet, außerdem wird dauernd der Färbehälter geschwenkt.

Nach der Färb- und Entfärbeprozedur werden die Folien wieder zwischen Zellstofflagen bei Zimmertemperatur getrocknet. Diese trockenen gefärbten Folien werden dann photometriert.

b) Photometrische Auswertung:

Die getrockneten, gefärbten Papierfolien werden zuerst im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) mit einer Elphorthtransparenzflüssigkeit getränkt. Die dann transparenten Folien werden nach Streifen geordnet (5 Lysewerte und der dazugehörige 0 % Lysekontrollwert - numeriert nach Zusammengehörigkeit) zwischen zwei dünne Glasplatten gelegt und so durch das Elektrophorese-Auswertegerät geschickt (Elphor Integrator, Bender & Hobein). Die Extinktionswerte werden automatisch in Kurvenform auf eingelegtes Millimeterpapier gestanzt; außerdem werden an einem Zählwerk die Planimeterwerte direkt abgelesen.

Wir notieren von jeder Folie (3 cm breit) nur die planimetrierten Extinktionswerte der inneren 2 cm, da sich am Rande physikalische Phänomene störend auswirken (Blendenbreite, Zwischenraum zwischen den einzelnen Folien etc.). Es wird also die Extinktion einer rechteckigen Fläche von 2 x 3,9 cm gemessen. - Von dieser Fläche werden durch den Apparat Teilflächen von 0,1 x 3,9 cm gemessen und jeweils als ein Punkt einer Kurve aufgezeichnet, so daß die ausgewerteten 2 cm 20 Punkte in Kurvenform ergeben.

Bei absolut gleicher Anfärbung über die ganze Breite von 2 cm müßten die 20 Punkte auf einer Geraden liegen - dies ist tatsächlich aber nur angenähert der Fall; - die hier gemessene Menge des aufgenommenen Amidoschwarzes soll proportional dem Fibringehalt der Folie sein.

In unserem Fall wird die Summe der einzelnen Teilflächen (0,1 x 3,9 cm) durch ein automatisches Planimetrierzählwerk in dem ablesbaren Planimeterwert gleich zusammengefaßt, braucht also nicht erst errechnet zu werden.

Dividiert man den erhaltenen Planimeterwert (Flächenwert) durch 2 (cm der Plateaubreite), so erhält man die Plateauhöhe der "geraden" waagerechten Kurve. Wir rechnen hier als Plateauhöhe den Abstand zwischen der Kurve des 100 %-Lysekontrollwertes und der Kurve des 0 %-Lysekontrollwertes, müssen also vor der Division durch 2 den Planimeterwert des ersteren von dem des letzteren subtrahieren.

Die Lysequote in Prozent wird also mit Hilfe des erhaltenen Lysewertes (Planimeterwert!) und des 0 %-Lysekontrollwertes (=Fibrinwerte) und des 100 %-Lysekontrollwertes (Leerwert) nach folgender Formel errechnet:

$$100 - \frac{(\text{Lysewert} - \text{Leerwert}) \times 100}{(\text{Fibrinwert} - \text{Leerwert})} = \text{Lysequote in Prozent}$$

Für die Auswertung ist die homogene Anfärbbarkeit der Papierfolien - gleichmäßige Verteilung des Fibrins - von großer Wichtigkeit. Dies wird

gewährleistet durch Gleichmäßigkeit in der Herstellung der Fibrinpapierfolien.

Über diese Art der Färbetechnik, der Auswertemethode und deren Fehlermöglichkeiten finden sich weitere allgemeine Angaben bei Graßmann und Hannig (61, 62) und Wallner (143).

Bezugswerte:

Um Aussagen über die Menge (Relativprozente) des herausgelösten Fibrins machen zu können, werden die Lysepapierfolien (=Lysewerte) in Beziehung gesetzt zu Fibrinpapierfolien, die in nicht aktiviertem Plasma inkubiert wurden, und Papier, das überhaupt nicht mit Fibrin präpariert wurde. Ersteres wird als 0 %-Lysekontrollwert (=Fibrinpapier-Vollwert), letzteres als 100 %-Lysekontrollwert (=Leerwert) deklariert.

Fibrinpapier = 0 %-Lyse-Kontrolle:

Eine von sechs Folien eines Fibrinpapierstreifens wird jeweils in einer nicht aktivierten Plasmaverdünnung inkubiert. Die hierzu verwendete nicht aktivierte Kontrollplasmaverdünnung besteht aus gepooltem Plasma gesunder Versuchspersonen, das i. A. 24 - 48 Stunden im Kühlschrank (5° C) aufbewahrt wurde. Grundsätzlich konnte festgestellt werden, daß ohne SK-Zusatz ein Zitratplasma nicht in der Lage ist, mit dieser Methode messbare fibrinolytische Aktivität zu zeigen.

Das Fibrinkontrollpapier wurde sonst (außer der Inkubierung mit aktiviertem Plasma) genau denselben Prozeduren unterzogen (Vorwässerung, Wässerung, Färbung, Auswertung) wie die Lysefibrinpapierfolien.

Wir stellten fest, daß bei dieser Behandlung des 0 %-Lyse-Kontrollwertes gegenüber nur gefärbten, sonst aber unbehandelten Fibrinpapierfolien ungefähr 20 % der Anfärbbarkeit (des Fibrins) verloren gehen. - Da jedoch Kontrollwert und Testwert einer bis auf die Inkubation völlig gleichen Behandlung ausgesetzt werden, darf dieser Verlust an Fibrin bei der Beurteilung der Auswertung wohl vernachlässigt werden.

Leerwert = 100 %-Lyse-Kontrolle:

Im Verlauf der Arbeit wurde der Leerwert prinzipiell drei Prozeduren unterworfen: 1) anfangs wurde nur das reine Elphorpapier mit Amidoschwarz gefärbt und anschließend mit Elphorentfärbter entfärbt; 2) dann wurde der Leerwert ebenso behandelt wie der Vollwert (s.o.); 3) zuletzt wurde ein einziger "ständiger" Eichleerwert über längere Zeit benutzt. Analog der Auswertung bei der Papierelektrophorese dient der sogenannte Leerwert zur Einstellung einer Apparatkonstanten. Er gilt als 100 %-Lyse-Bezugswert, da er primär nicht mit Fibrinogen-Fibrin imprägniert wurde, jedoch wie das Test- und Kontrollfibrinpapier mit Amidoschwarz gefärbt wurde.

Das Amidoschwarz läßt sich bei der Entfärbung nicht vollständig aus dem Leerpapier entfernen (61).

Eine Inkubierung des Leerwertes mit Plasma erübrigte sich, da bei informativen Versuchen die Plasmae Proteine durch Wässerung praktisch vollständig wieder auswaschbar sind.

Beim Extinktionsvergleich von Leerwerten mit und ohne 22-stündiger Wässerung ergaben sich keine Abweichungen, weshalb auch auf die Wässerung der Leerwerte verzichtet wurde, nachdem vorher längere Zeit die Leerpapiere immer bei allen Prozessen mitgeführt wurden.

Ein Vergleich mehrerer verschiedener für jeweils 6 Folien eines Streifens zur Kontrolle angefertigter Leerwerte ergab Unterschiede von $\pm 0,4$ Extinktionseinheiten (Planimeterwert) bei mittlerer Empfindlichkeit des Auswertegerätes.

Gleiche Schwankungen zeigten sich bei 20 gesondert untersuchten Leerwerten (die inkubiert, gewässert und gefärbt wurden), und aus denen wir dann den Leerwert wählten, der gerade dem Mittelwert der 20 Leerwerte entsprach.

Diesen benutzten wir dann als einzigen Eichleerwert für eine längere Zeit bei verschiedenen Ansatzreihen.

Aufbewahrt wurde dieser Eichleerwert unter Lichtabschluß in der Elphortransparenzflüssigkeit. - Er änderte zwar seinen Extinktionswert im Verlauf von 4 Monaten, blieb dabei aber im Bereich der Schwankungsbreite frisch hergestellter Leerwerte. Dieser etwas nachdunkelnde Eichleerwert hat zwar den Nachteil, daß er die Spanne zwischen Leerwert und Fibrinwert in geringerem Maße verkleinert, was sich dahin auswirken kann, daß ein Lysewert bezogen auf den etwas dunkleren Leerwert schon 100 % Lyse anzeigt, während er bei dem helleren Leerwert erst 95 % Lyse anzeigen würde.

Der Vorteil ist aber, daß man mit diesem Eichleerwert den Apparat über längere Zeit immer wieder auf die gleiche Empfindlichkeit einstellen kann, während bei stets wechselnden Leerwerten auch die Einstellung der Empfindlichkeit unkontrollierbar wechselt.

So ergibt bei gleicher Einstellung bei zwei verschiedenen Leerwerten (hier Extremwerte), z.B. Leerwert a = 1,5 und Leerwert b = 2,3 Extinktionseinheiten, und Lysewerten von z.B. 2,5; 4,5; und 9,5 Extinktionseinheiten bei einem Fibrinkontrollwert von 15,0 Extinktionseinheiten eine Lysequote von 93 %; 78 %; und 41 % bei Leerwert a; dagegen jedoch von 98 %; 83 % und 43 % bei Leerwert b. - Wir erhalten also bei hohen Lysequoten eine Abweichung von 5 % Lyse, wobei aber die Einstellung der Empfindlichkeit des Apparates nicht kontrolliert werden kann, da ja kein fester Wert vorhanden ist, sondern die Einstellung stets auf den je-

weiligen Leerwert abgestimmt wird.

Benutzt man dagegen ein und denselben Leerwert für viele Ansatzreihen, so kann man stets die gleiche Empfindlichkeit einstellen, somit die aufgezzeichneten Kurven direkt miteinander vergleichen und die Schwankungen von Leerwert zu Leerwert entfallen.

Eine Fehlerberechnung der Methode versuchten wir aus Mangel an größeren Zahlen von Lyseergebnissen aus jeweils gleichartigen Ansätzen (technische Schwierigkeiten) folgendermaßen:

- 1) Bei 382 Doppelbestimmungen errechneten wir die Differenz der beiden Ergebnisse, - z.B. bei 82 % und 87 % Lyse, die Differenz von 5 % Lyse; aus der Summe der 382 Differenzen bestimmten wir dann den Wert, um den im Mittel die beiden Werte einer Doppelbestimmung voneinander abweichen: diese mittlere Differenz beträgt 3,6 % Lyse.

Bei der Errechnung der Mittelwerte der einzelnen Doppelbestimmungen und Einteilung dieser Mittelwerte in die Gruppen 0 - 10 %; 10 - 20 %; 20 - 30 % Lyse etc. fanden wir folgende Verteilung der durchschnittlichen Differenzen auf die einzelnen Gruppen.

Mittelwert der Lysequote liegt zwischen	Zahl der Doppelbestimmungen	Summe der Differenzen	durchschnittl. Differenz	Variationsbreite der Differenzen
0 - 10 %	n - 12	67	5,5	0 - 11
11 - 20 %	23	84	3,7	0 - 11
21 - 30 %	18	79	4,4	0 - 12
31 - 40 %	21	60	2,9	0 - 14
41 - 50 %	38	153	4,0	0 - 13
51 - 60 %	33	173	5,2	0 - 17
61 - 70 %	36	174	4,8	0 - 10
71 - 80 %	55	243	4,4	0 - 11
81 - 90 %	55	182	3,3	0 - 10
91 - 100 %	91	178	1,8	0 - 8

Tabelle I: Die Mittelwerte der Lysequoten von 382 Doppelbestimmungen wurden in 10 Gruppen zwischen 0 und 100 % Lyse aufgeteilt. Zu jeder Gruppe wurde die durchschnittliche Differenz der Doppelbestimmungen errechnet.

II) Von einigen Mehrfachbestimmungen (4 - 8 gleichartige Ansätze von gleichem gepoolten Plasma, aber mit Fibrinpapierfolien verschiedener Streifen, die ja jeweils 5 - 6 Folien liefern) errechneten wir den arithmetischen Mittelwert. - Zu dem Mittelwert werden die Variationsbreite und die Differenz zwischen dem niedrigsten und höchsten Wert angegeben:

Zahl der Ansätze	Mittelwerte der Lysequoten	Variationsbreite der Lysequoten	Differenz zwischen Extremen d. Ergebnisse
5	2 % Lyse	0 - 4 %	4
6	19 % "	14 - 28 %	14
6	25 % "	20 - 30 %	10
6	53 % "	49 - 59 %	10
6	56 % "	50 - 60 %	10
4	71 % "	69 - 77 %	8
8	89 % "	86 - 93 %	7
8	94 % "	93 - 97 %	4
8	95 % "	94 - 97 %	3

Tabelle II: Von einigen Mehrfachbestimmungen - zwischen 4 und 8 gleichartige Ansätze mit gleichem gepoolten Plasma - errechneten wir den arithmetischen Mittelwert der Lysequoten. Zu jedem Mittelwert sind die Variationsbreite und die Differenz zwischen dem niedrigsten und höchsten Wert angegeben.

Zum Vergleich soll ein informativer Versuch dienen, bei dem 5 Papierfolien aus einem Streifen miteinander verglichen wurden. Dabei wurde ein arithmetischer Mittelwert von 51 % Lyse ermittelt. Die Variationsbreite betrug 5-Lyse % (49 - 54 % Lyse).

Aus Tabelle I und II kann man ziemlich übereinstimmend ersehen, daß bei den höchsten Lysewerten die Variationsbreiten am geringsten sind, die einzelnen Ergebnisse also am besten übereinstimmen, während gerade bei den mittleren (40 - 70 %) und den ganz niedrigen Lysequoten (0 - 10 %) die Ergebnisse mehr differieren. - In diesen Bereichen kann man nur von deutlichen Unterschieden zwischen 2 verschiedenen Lysewerten sprechen, wenn die Differenz der Mittelwerte mindestens 15 % beträgt.

Die Benutzung einer Rolle zur Beseitigung der überstehenden Fibrinogenlösung bei der Papierpräparation ist wohl ein wesentlicher Grund, daß die durchschnittliche Differenz bei Doppelbestimmungen gegenüber früher (Ab-

streifen der überstehenden Flüssigkeit indem der Streifen über ein weiltumiges Reagenzglas gezogen wurde) von ca. 8 % auf 3,6 % gesenkt werden konnte.

Sicher würden die Ergebnisse noch übereinstimmender, wenn die Homogenität der Fibrinogen - Fibrinfraktion des Papiers durch Arbeiten mit größeren Mengen von Lösungen verbessert werden kann.

Neben der Papierfibrinolyse als "Hauptmethode" wurden zwei weitere Methoden angewandt: der Streptokinaseresistenztest und die Spontanfibrinolyse.

Das Zitratplasma für beide Methoden wird in gleicher Weise gewonnen, wie für die Papierfibrinolyse: das Blut wurde vormittags zwischen 10 und 12 Uhr abgenommen und gleich mit Zitrat versetzt. Das Zitratblut stand dann noch 1 - 2 Stunden im Kühlschrank (5°C) und wurde dann 10 min bei 3 000 U/min zentrifugiert. Das abgeheberte Zitratplasma kam (außer für die Spontanfibrinolyse, die gleich angesetzt wurde) nochmal für ungefähr 1 Stunde in den Kühlschrank, bevor es verarbeitet wurde.

1) Der Streptokinase-Resistenz-Test (SK-R-Test):

zum Nachweis von Inhibitoren der SK-Aktivierung.

Der ursprünglich für therapeutische Zwecke entwickelte Test (nach Fletcher, angegeben bei Deutsch 39) zur Erfassung von Antistreptokinasen, erschien auch für unsere Versuchsanordnung besonders wichtig, um die nach SK-Zusatz zum Zitratplasma definitiv zur Verfügung stehende Streptokinaseaktivität zu erfassen. Der Originaltest ist für Zitratblut (1 : 10) angegeben:

9 Röhrchen mit je 0,8 ml Zitratblut werden erst mit jeweils 0,1 ml einer SK-Lösung aus einer Reihe mit steigender Konzentration (10; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 750 und 1 000 E/ml, gelöst in isotonischer NaCl-Lösung) und dann mit 0,1 ml Thrombinlösung (10 NIH E/ml) gelöst in aqua bidest.) versetzt.

Um Material zu sparen, modifizierten wir den Test dahin, daß wir statt des unverdünnten Zitratblutes ein 1 : 10 mit Veronalpuffer (p_H 7,3) verdünntes Zitratplasma benutzten. Entsprechend der Plasmaverdünnung, verminderten wir die SK-Menge und die Thrombineinheiten. So betragen die SK-Einheiten jetzt: 1; 5; 10; 20; 30; 40; 50; 75 und 100 E/ml NaCl-Lösung. Thrombin: 1 NIH E/ml aqua bidest. . Also werden jetzt zu 0,8 ml 1 : 10 verdünnten Zitratplasma 0,1 ml der jeweiligen SK-Konzentration und 0,1 ml der Thrombinlösung (1 E/ml) gegeben. - Gleich nach der Thrombinzugabe werden die verschlossenen Gläser zur Durchmischung einmal um 180° gekippt. Nach 10 min wird abgelesen und festgelegt, welche ge-

ringste SK-Menge imstande ist, die Hemmstoffe der individuellen Plasma(Blut)-probe zu neutralisieren und somit eine vollständige Lyse zu ermöglichen.

Wir definieren folgendermaßen: wenn z.B. im Röhrchen mit "20 E" SK noch Reste des Gerinnsels zu sehen sind, im folgenden mit "30 E" eine totale Lyse eingetreten ist, schreiben wir: Streptokinaseresistenztest: 20/30.

Der wesentliche Grund, die Originalmethode in dieser Weise zu modifizieren, war der Wunsch, Untersuchungsmaterial zu sparen; es ergab sich hierbei auch eine ähnliche Verdünnung des Plasmas von 1 : 12, wie bei der Papierfibrinolyse.

Beim Vergleich beider Ansätze - einmal Zitratblut, einmal verdünntes Zitratplasma vom gleichen Probanden - fanden wir übereinstimmende Ergebnisse: also beim Test mit Zitratblut, z.B. bei 100/200, beim Test mit Zitratplasma bei 10/20 den Übergang zu vollständiger Lyse. - In einigen Fällen zeigte der Plasmaansatz ein um eine Stufe höheres Ergebnis an: also bei 100/200 mit Zitratblut nicht entsprechen 10/20, sondern 20/30 - man kann nämlich im Plasma noch feinste Gerinnselreste sehen, die im Blut wahrscheinlich durch die Erythrozyten schon völlig verdeckt werden.

2) Spontanfibrinolyse:

Es wird der Ansatz benutzt, der von Müller (96) nach der Methode von Macfarlane und Biggs (148) modifiziert wurde: Das Zitratplasma (1 : 10) wird mit Veronalpuffer (p_H 7,3) im Verhältnis 1 : 64 verdünnt - Endvolumen 1,6 ml. Es werden jeweils Doppelansätze gemacht. Zu den 1,6 ml. der Plasmaverdünnung werden 0,1 ml von in aqua bidest. gelösten Thrombin (20 NIH E/ml) gegeben. Zur Durchmischung werden die Gläser kurz vertikal rotiert. Anschließend kommen die Ansätze verkorkt für 22 Stunden in ein Wasserbad von 37° C.

Die entstehenden Gerinnsel sind homogen und zeigen nur leichte Retraktion. Im Doppelansatz zeigen sich stets gleiche Ergebnisse. Die wahrscheinlich proteolytische Wirkung des Thrombins dürfte gering sein und ist außerdem ein konstanter Faktor. Nur vollständige Lysen des Gerinnsels und solche mit nur geringem Bodensatz (kleine Bruchstücke des Gerinnsels) werden als positive Ergebnisse registriert, alles andere wird als negatives Ergebnis der Spontanfibrinolyse bezeichnet.

ER G E B N I S S E

- A) Weitere Untersuchungen zur Methodik der Papierfibrinolyse.
- B) Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen den Lysequoten der Papierfibrinolyse und anderen klinischen Befunden.

AI) Präparation der Fibrinpapierfolien

- a) Gleichmäßigkeit der Fibrinimprägnation der Folien.

Wie oben angeführt, wird die Extinktion einer rechteckigen Fläche von $2 \times 3,9$ cm gemessen. Der Apparat zeichnet die Extinktionswerte in Form einer Kurve, bestehend aus 20 Punkten, auf. Ein Punkt entspricht dem Extinktionswert einer Fläche von $0,1 \times 3,9$ cm.

Der ablesbare Planimeterwert umfaßt den Extinktionswert der Fläche $2 \times 3,9$ cm. - Zur Auswertung wird die Fläche zwischen der Kurve des Leerwertes als Basislinie und der Kurve des jeweiligen Lysewertes oder Fibrinkontrollwertes genommen. Um die Plateauhöhe zu erhalten, also den Abstand zwischen Basislinie (Leerwert) und Kurve des Fibrinwertes (Lysewert oder 0 %-Lyse-Kontrollwert), muß zuerst der Planimeterwert des Leerwertes von dem des Fibrinwertes subtrahiert werden und dann der verbleibende Wert der Fläche zwischen Basislinie und Kurve des Fibrinwertes durch 2 dividiert werden ($2 = \text{Breite der Fläche}$), wobei hier vernachlässigt wird, daß die Kurve des Fibrinwertes nicht dem Ideal einer Geraden entspricht, sondern mehr oder weniger stark abweicht.

Unter Verwendung dieses Wertes der Plateauhöhe haben wir Fibrinwerte (0 %-Lyse-Kontrollwerte) auf die Übereinstimmung ihrer Extinktion untersucht:

- 1) Von 6 Fibrinpapierfolien aus einem Streifen, die nur gefärbt wurden, berechneten wir

den Mittelwert der Plateauhöhen 95,6 mm

die Standardabweichung 1,035.

Somit liegt der Normalbereich (Mittelwert $\pm 2s$) zwischen 93,53 und 97,67 mm

$2s = 2,07$ mm sind 2,1 % des Mittelwertes der Plateauhöhen.

- 2) Von 6 Fibrinpapierfolien eines Streifens, die 22 Stunden bei Zimmertemperatur in isotonischer NaCl-Lösung gewässert wurden, berechneten wir entsprechend

den Mittelwert der Plateauhöhe 72,9 mm

die Standardabweichung 2,26.

Somit liegt hier der Normalbereich zwischen 68,4 und 77,4 mm
 $2s = 4,52 \text{ mm} = 6 \% \text{ des Mittelwertes der Plateauhöhe.}$

- 3) Von 20 Fibrinkontrollwerten - in nicht aktiviertem Plasma inkubiert und anschließend 22 Stunden in isotonischer NaCl-Lösung gewässert - aus 20 verschiedenen in einem Arbeitsgang hergestellten Fibrinpapierstreifen wurde ebenfalls der Mittelwert der einzelnen Plateauhöhen bestimmt:

Mittelwert der Plateauhöhen 83,3 mm

die Standardabweichung s 3,7.

Somit liegt der Normalbereich zwischen 75,9 und 90,7 mm

$2s = 7,4 \text{ mm} = 9 \% \text{ des Mittelwertes.}$

- 4) In seltenen Fällen kann es zu größeren Unterschieden der Plateauhöhen kommen, deren Ursachen möglicherweise Chargendifferenzen des Fibrinogens sind oder andere nicht bekannte Einflüsse. Dabei fallen einige Fibrinkontrollwerte aus der Reihe der anderen heraus. Die Standardabweichung kann dann einmal erheblich größer sein, wie z.B. bei folgenden 14 Fibrinkontrollwerten:

Mittelwert der Plateauhöhen 73,2 mm

die Standardabweichung s 6,02.

Somit liegt der Normalbereich zwischen 61,2 und 85,2 mm

$2s = 12,04 \text{ mm} = 16 \% \text{ des Mittelwertes.}$

Trotz dieser starken Abweichungen von Streifen zu Streifen ist bei Mehrfachbestimmungen, bei denen 1 Bestimmung auf jeweils einem Streifen durchgeführt wird, die Differenz zwischen den einzelnen Werten dieser Mehrfachbestimmungen nicht so groß, wie dem Unterschied der Fibrinkontrollwerte entspräche - vielleicht werden bei weniger vorhandenem Fibrin auch weniger fibrinolytisch wirksame Faktoren in der Zeit der Inkubation adsorbiert.

- 5) Von 5 Lysewerten eines Streifens, die in gleicher Weise in gepooltem, mit SK aktiviertem Plasma inkubiert worden sind, errechneten wir den

Mittelwert der Plateauhöhen 38,9 mm

die Standardabweichung 1,7.

Somit liegt der Normalbereich zwischen 35,5 und 42,3 mm;

$2s = 3,4 \text{ mm} = 4 \% \text{ des Fibrinkontrollwertes (79,5 mm)}$

$= 9 \% \text{ des Lysemittelwertes (38,9 mm).}$

A1)

b) Die Empfindlichkeit verschieden präparierter Papiere gegenüber der Fibrinolyse

- (1) Fibrinpapier, das nach der Fibrinogen- und vor der Thrombintränkung 1 Stunde getrocknet wurde; es entspricht unserem "Standardpapier".
- (2) Fibrinpapier, das nach der Fibrinogentränkung noch leicht feucht durch die Thrombinlösung gezogen wurde.
- (3) Fibrinogenpapier: das Papier wurde nur durch die Fibrinogenlösung gezogen und getrocknet.

Von diesen 3 Papierpräparationen wurden jeweils ein Teil 30 min auf 90° C erhitzt. Alle Papierpräparationen wurden dann an gepooltem Plasma auf ihre Empfindlichkeit gegen fibrinolytische Aktivität getestet; die Lysequoten sind in der Tabelle III zusammengestellt. - Zu beachten ist dabei, daß die 0 %-Lyse-Kontrollwerte des Fibrinogenpapiers eine um 20 - 30 % niedrigere Plateauhöhe zeigen als die des Fibrinpapiers, was vielleicht dadurch zu erklären ist, daß der Farbstoff zum Fibrinogen eine geringere Affinität hat als zum Fibrin; oder daß das Fibrinogen beim Wässerungsprozeß leichter gelöst wird und dadurch niedrigere Extinktionswerte bedingt.

Plasma - verdünnung	Lysequoten in %					
	Papierpräparationen nativ			Papierpräparationen erhitzt		
	(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
1 : 10	75	82	66	60	68	58
1 : 20	59	68	57	47	50	53
1 : 40	44	54	35	35	38	33
1 : 80	28	33	28	21	29	25

Tabelle III: 3 verschiedene Papierpräparationen (siehe Text) wurden auf 90°C erhitzt oder bei Zimmertemperatur getrocknet (nativ) und dann in einer Plasmaverdünnungsreihe auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Fibrinolyse und der Fibrinogenolyse getestet. Das Plasma wurde nach der Verdünnung mit 50E SK/ml Plasma aktiviert.

Aus der Tabelle III wird ersichtlich, daß die größte Lysequote bei der Präparation 2 zu finden ist: diese Präparation ist aber nicht brauchbar, da infolge des noch feuchten Fibrinogenpapiers sich in der Thrombinlösung feinste Fibringerinnsel bilden, die sich dann unregelmäßig dem Papier auflagern und es bei der Färbung fleckig erscheinen lassen - also die Homogenität der Präparation stören.

Die Erhitzung bewirkt bei den Fibrinpapieren einen deutlichen Empfindlichkeitsverlust (10 - 15 % Lyse). - Auffallend ist, daß auch noch bei einer Verdünnung 1 : 80 eine messbare Lyse nachzuweisen ist, die jedoch bei den verschiedenen Präparationen weitgehend gleiche Ergebnisse zeigt.

A1) Haltbarkeit der Fibrinpapiere bei der Aufbewahrung

c) Wir prüften die Haltbarkeit der Fibrinpapiere bei Aufbewahrung im Exsiccator (CaCl_2) bei Zimmertemperatur. Verschieden lange gelagerte Papierfolien wurden in Standardansätzen jeweils in Doppelansätzen getestet.

Lagerungszeit des Fibrinpapiers	Lysequoten in %			
	Plasma I	Plasma II	Plasma III	Plasma IV
12 Tage	65, 61	78, 74	47, 43	38, 35
210 "	62, 67	82, 82	46, 48	34, 32

Tabelle IVa: Versuchsreihe 1

Lagerungszeit des Fibrinpapieres	Lysequote in %			
	Plasma I	Plasma II	Plasma III	Plasma IV
3 Tage	22, 23	42, 45	23, 24	41, 43
22 "	23, 28	41, 47	29, 30	39, 44
190 "	14, 14	38, 45	23, 25	37, 45

Tabelle IVb: Versuchsreihe 2

Tabelle IV a u. b: verschieden lange im Exsiccator bei Zimmertemperatur gelagerte Fibrinpapiere wurden in 2 Versuchsreihen mit jeweils 4 Plasmen im Standardansatz getestet, ob die Empfindlichkeit der Papiere bei der Lagerung abnimmt.

Die Tabellen IV a und b zeigen die Lysequoten, die mit jeweil 4 verschiedenen Plasmen und Fibrinpapierfolien verschiedener Papierchargen und verschiedener Lagerzeit erhalten wurden. Die Ergebnisse zeigen, daß auch bei längerer Lagerung im Exsiccator bei Zimmertemperatur die Empfindlichkeit der Papiere gegen das fibrinolytische Ferment sich kaum verändert.

A II) Untersuchungen zur Wässerung der (inkubierten) Fibrinpapiere.

- a) Einfluß der Zeit, b) Einfluß der Temperatur,
c) Einfluß der epsilon-Aminocapronsäure (eACS).
- a) Ursprünglich wurde nach einer Vorwässerung von 15 min in fließendem Leitungswasser eine Wässerung in physiologischer NaCl-Lösung über 22 Stunden angeschlossen, weil wir annahmen, daß die völlige Herauslösung der adsorbierten Plasmaproteine und des bereits gelösten Fibrins eine so lange Wässerungszeit erfordere.

Wir untersuchten dann Lyseergebnisse nach verschiedenen Wässerungszeiten und stellten fest, daß mit zunehmender Wässerungszeit eine zunehmende Extinktionsverminderung eintritt. Weitere Versuche sollten klären, inwieweit diese Extinktionsverminderung bei der Auswertung nur auf die bei der Wässerung erfolgte Eluierung von Plasmaproteinen und Fibrinabbauprodukten beruht oder ob es sich um eine Fortsetzung des Lyseprozesses handelt.

Es wurde dabei der "normale Wässerungsprozeß" - 20 - 22 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung bei Zimmertemperatur - verglichen mit Ansätzen, bei denen die fibrinolytische Aktivität entweder thermisch (Wässerung bei 5° C) oder durch einen Inhibitor der Fibrinolyse, der epsilon-Aminocapronsäure (eACS) in verschiedenen Konzentrationen, größtenteils blockiert wurde. - Dabei ergab sich bei den beiden letzteren Ansätzen eine höhere Extinktion als bei den Standardansätzen; diese könnte so gedeutet werden, daß offenbar der Lyseprozeß bei der Wässerung noch andauert. Dafür spricht auch, daß die sofortige Trocknung der Papierfolien nach der Vorwässerung allein deutlich höhere Extinktionswerte ergibt im Vergleich zu Ansätzen mit anschließender längerer Wässerung in physiologischer NaCl-Lösung.

Um nun zu prüfen, ob und wieviel Fibrin der Wässerungsprozeß per se (ohne vorherige Inkubation der Folie in aktiviertem Plasma) aus dem Papier zu lösen imstande ist, wurden verschiedene Fibrinpapierfolien ohne vorherige Inkubation 16, 24 und 90 Stunden in physiologischer NaCl-Lösung (p_H 5,5) gewässert. Dabei ergab sich eine ziemlich konstante Herauslösung von Fibrin zwischen 15 und 25 %, bezogen auf den Wert nicht gewässerten Fibrinpapiere, wobei hier die zeitlichen Unterschiede der Wässerungsdauer in den Extinktionswerten nicht zum Ausdruck kamen. Jedoch ergaben sich bei einer Wässerung bei 5° C etwas höhere Extinktionswerte als bei einer Wässerung bei 22° C. Veronalpuffer (p_H 7,3) scheint als "Wässerungsmittel" den gleichen Effekt zu haben, wie die NaCl-Lösung, aqua bidestillata dagegen etwas weniger Fibrin herauszulösen.

Aus Tabelle V sind Lyseergebnisse zu ersehen, die mit sieben verschiedenen Plasmen erzielt wurden: die ganze Versuchsanordnung entspricht unserem Standardansatz, nur die Dauer der Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung ist variiert. - Bezogen wurden diese Lysewerte auf standardmäßig behandelte 0 %-Lyse-Kontrollwerte.

Wässerungs- zeiten	Lysequoten in %						
30 Minuten	19, --	11, 13	4, 0	4, 0	0, --	24, --	4, --
16 Stunden	70, 71	66, 68	62, 63	60, 65	22, 24	73, 74	54, 57
24 Stunden	94, 95	89, 90	83, 85	89, 91	41, 50	93, 94	79, 86

Tabelle V: 7 verschiedene Plasmen wurden in dieser Versuchsreihe mit je 5 oder 6 Fibrinpapieren entsprechend unserem Standardansatz getestet. Nur die Wässerungszeit nach der Inkubation wurde für die einzelnen Fibrinpapiere variiert, um den Einfluß der Wässerungsdauer auf die Lysequote festzustellen.

Es zeigt sich hier also eine deutliche Abhängigkeit der Lysequote von der Dauer der anschließenden Wässerung.

Wie aber Tabelle VI zeigt, sind auch schon erhebliche Lysequoten nach 3-stündiger Wässerung zu erzielen, wenn die zur Aktivierung des fibrinolytischen Fermentes verwendete SK-Menge erhöht wird - hier auf 500 E/ml statt 50 E/ml - ein informativer Versuch deutet auch hier eine Abhängigkeit von der Wässerungsdauer an.

Wässerungs- zeiten	Lysequoten in % nach Aktivierung mit 500 E SK/ml Plasma					
3 Stunden	43, 47	50, 52	42, 42	48, 51	55, 58	42, 46
22 Stunden	78, 82					

Tabelle VI: 6 verschiedene Plasmen wurden mit 500 E SK/ml Plasma aktiviert. Es zeigte sich schon nach 3 Stunden Wässerung in physiologischer NaCl-Lösung eine deutliche Lyse. Nur in einem Fall wurde zum Vergleich 22 Stunden gewässert.

In den folgenden Versuchen soll nun noch geklärt werden, ob der fermentative Abbau von Fibrin fort dauert oder nur adsorbierte Plasmaproteine und Bruchstücke schon gelösten Fibrins aus dem Papier gelöst werden.

b) Der Einfluß der Temperatur bei der Wässerung.

Es ist anzunehmen, daß ein fermentativer Prozeß bei einer niedrigeren Temperatur (+ 5° C) wenn auch nicht völlig gehemmt, so doch deutlich verlangsamt wird.

Wässerungs- temperatur	Lysequoten in %					
22° C	91,98	73,75	98,99	100,100	99,100	99,100
5° C	33,35	15,16	45,49	60,66	66,68	53,58

Tabelle VII: Fibrinpapiere wurden in 6 verschiedenen Plasmen entsprechend unserem Standardansatz inkubiert. Dann wurde jeweils ein Teil der Papiere bei 22° C, ein Teil bei 5° C in physiologischer NaCl-Lösung gewässert.

Die Tabelle VII zeigt eindeutig eine geringe Lysequote nach einer Wässerung bei +5° C gegenüber der bei +22° C erreichten Lysequote.

Diese Ergebnisse machen eine Hemmung des fibrinolytischen Fermentes durch die niedrigere Temperatur wahrscheinlich. Eindeutiger wird diese Frage nach der Fortdauer der fibrinolytischen Aktivität in der folgenden Versuchsreihe beantwortet.

c) Anwendung der epsilon-Amino-Capron-Säure (eACS) als Inhibitor der SK-aktivierten Fibrinolyse.

Über die Wirkung der eACS ist im Abschnitt über Inhibitoren der Fibrinolyse im ersten Teil dieser Arbeit ausführlich berichtet worden.

In Vorversuchen im Reagenzglas untersuchten wir, bei welcher geringsten Konzentration der eACS die durch SK aktivierte Fibrinolyse vollständig gehemmt wird:

Wir gaben in 6 Gläser: 6 ml isotonische NaCl-Lösung
1 ml Zitratplasma
1 ml SK - 10 E/ml

in 5 Gläser: 1 ml eACS in steigender Konzentration
0,5 - 5 - 50 - 100 - 200 mg/ml

in alle Gläser: 1 ml Thrombin (10 NIH E/ml) zur Gerinnselbildung.

Die Gläser enthielten dann 0,05 - 0,5 - 5,0 - 10 - 20 mg eACS pro ml Gesamtlösung. - Ins 6. Glas ohne eACS wurde statt eACS 1 ml physiologische NaCl-Lösung gegeben. Die Ansätze kamen dann in ein Wasserbad (37° C). In allen 6 Gläsern fand eine gleichmäßige Gerinnungsbildung statt.

Nach 22 Stunden war in dem Glas ohne eACS eine komplette Lyse, in dem Glas mit 0,05 mg eACS pro ml Gesamtlösung eine deutliche Lyse eingetreten, bei höheren eACS-Konzentrationen war keine Lyse eingetreten - also zeigte sich eine zunehmende Hemmung der Lyse mit zunehmender Menge der eACS.

Aufgrund dieser Vorversuche nahmen wir an, mit eACS-Konzentrationen von 10 mg pro ml Gesamtlösung des Inkubationsansatzes auch bei unserer Papierfibrinolyse eine vollständige Hemmung zu finden. - Bei Zusatz der eACS schon zum Inkubationsansatz fanden wir bis hinauf zu 20 mg pro ml Gesamtlösung unseres Standardansatzes keine Hemmung durch eACS (s. da - zu auch Deutsch 41).

Wurden dagegen die Fibrinpapierfolien nach der Inkubation erst 15 min vorgewässert und dann für 10 min in eine eACS-Lösung gebracht - 10 mg/ml, verdünnt mit physiologischer NaCl aus einer Stammlösung von 400 mg/ml -, so war gegenüber den nicht mit eACS behandelten Folien eine deutlich niedrigere Lyse zu finden.

SK-Einheiten pro ml Plasma	Lysequoten in %	
	ohne eACS-Behandlung	mit eACS-Behandlung
10 E	39 , 42	3 , 6 , 6 , 7
	50 , 54	32 , 38
	45 , 46	26 , 27
	37 , 42	3 , 5
50 E	78 , 78	38
	90 , 91	60
	77 , 81	60 , 65
	75 , 75	32 , 33
	57 , 61	18 , 19
300 E	79 , 82	36 , 37
	82 , 82	46 , 48

Tabelle VIII: 3 Gruppen verschiedener Plasmen wurden mit jeweils anderen SK-Mengen aktiviert. Nach der Inkubation wurden einmal jeweils Fibrinpapiere "normal gewässert", einmal aber vor der 22stündigen Wässerung in physiologischer NaCl-Lösung wurden sie für 10 min in eine Lösung mit 10 mg eACS/ml NaCl-Lösung gelegt. (eACS - epsilon-Amino-Capron-Säure).

Tabelle VIII zeigt nun die Wirkung der eACS auf die nach der Inkubation in SK-aktiviertem Plasma bei der Wässerung weiter andauernde Lyse.

Aus den Ergebnissen ist ein deutlicher Inhibitoreffekt der eACS abzulesen, und es wird damit deutlich, daß das adsorbierte Plasmin bei der Wässerung weiterwirkt, wenn es nicht durch niedrigere Temperaturen oder Inhibitoren in seiner Aktivität gehemmt wird.

Anschließend soll in Tabelle IX der hemmende Einfluß einer niedrigen Temperatur (+5° C) bei der Wässerung mit dem Effekt der eACS bei "normaler Wässerung" bei 22° C verglichen werden. Es ergibt sich eine große Ähnlichkeit zwischen den Lysequoten nach der Wässerung bei +5° C und denen nach der Behandlung mit eACS und Wässerung bei 22° C.

Wässerungs- temperatur	Lysequoten in %		
	ohne eACS-Behandlung		mit eACS-Behandlung
	22° C	5° C	22° C
	52 , 60	13 , 9	9
	60 , 62	19 , 26	16
	61 , 62	14 , 16	18
	70 , 70	26 , 31	37
	78 , 80	34 , 38	43

Tabelle IX: Mehrere Plasmen wurden entsprechend unserem Standardansatz getestet. Nach der Inkubation wurde jeweils ein Teil der Fibrinpapier "normal gewässert". ein Teil vor der Wässerung mit einer Lösung von 10 mg eACS/ml 10 min behandelt; ein Teil schließlich wurde bei 5° C gewässert.

A III) Versuche zur Beurteilung des fibrinolytischen Potentials eines Plasmas

Wir untersuchten:

- die Lysequoten bei Aktivierung mit verschiedenen SK-Mengen bei sonst unverändertem Standardansatz.
- die Lyseergebnisse bei wiederholtem Inkubieren jeweils neuer Fibrinpapierfolien in demselben Ansatz.
- die Auswirkung der Verdünnung schon mit SK-aktivierten Plasmas auf die Lysequoten.

- a) Lysequoten jeweils ein und desselben Plasmas bei verschiedenen zur Aktivierung benutzten SK-Mengen zeigt Tabelle X: es wurden hier die uns aus praktischen Gründen besonders interessierenden SK-Mengen von 10, 50 und 300 E/ml Plasma untersucht.

SK-R-Test Ergebnisse	Lysequoten in % bei x SK-Einheiten pro ml Plasma		
	10 E	50 E	300 E
		0 , 6	75
		57	86
		72	93
1 / 5	83 , 85	93 , 95	
5 / 10	80 , 84	90 , 91	
5 / 10	58 , 64	87 , 89	
10 / 20	89 , 90	94 , 96	
10 / 20	81 , 85	88 , 89	
10 / 20	35 , 42	71 , 73	
10 / 20	39 , 42	67	79 , 82
20 / 30	38	71	95
30 / 40	68 , 70	87 , 90	
30 / 40	40 , 43	76 , 84	
50 / 75	57 , 57	82 , 82	
100 / 200	-6 , -9	6 , 10	
100 / 200	-12 , -7	0 , 10	

Tabelle X: Es wurden bei der Testung mehrerer Plasmen vom Standardansatz jeweils nur die SK-Mengen variiert. Die Ergebnisse des Streptokinase-Resistenz-Testes (SK-R-Test) sollen zeigen, daß die Hemmkörper der Streptokinase offenbar auch die Lyseergebnisse der Papierfibrinolyse beeinflussen.

Abbildung 1 (Anhang) zeigt einen Informativversuch mit SK-Mengen von 5 - 600 E/ml Plasma; es zeigt sich hier eine Abhängigkeit der Lysequote von der zur Aktivierung verwandten SK-Menge, wobei eine Steigerung der SK-Menge über 300 E pro ml Plasma keine weitere Steigerung der Lysequote zu ergeben scheint.

- b) Inkubation mehrerer Fibrinpapiere in einem Inkubationsplasma nacheinander.

Wir inkubierten das 1. Fibrinpapier wie üblich 15 min und wechselten es dann gegen das 2. frische Fibrinpapier aus, das ebenfalls 15 min im Ansatz blieb usf..

Alle inkubierten Papiere wurden wie üblich gewässert, gefärbt und ausgewertet.

In einigen Fällen gaben wir vor dem Einlegen des letzten Fibrinpapiers noch einmal 150 E SK zum Ansatz, was eine Steigerung der schon abgesunkenen Aktivität bewirkte (s. Tab. XI). Wie man aus der Tab. XI ersieht, wird das fibrinolytische Potential des Inkubationsansatzes in der Lysequote des 1. Fibrinpapiers nicht "erschöpfend" erfaßt.

SK-R-Test		Lysequoten in % bei den Fibrinpapieren Nr.					
Ergebnisse		1	2	3	4	5	6
5 / 10		88	71	80	100 (x)		
5 / 10		84	67	78	100 (x)		
10 / 20		65	25	28	99 (x)		
10 / 20		95	95	91			
10 / 20		97	97	97			
40 / 50		93	89	85			
10 / 20		76	58	43			
20 / 30		67	47	46			
40 / 50		64	36	34			
20 / 30	a	27	18	6	2	0	56 (x)
	b	70	64				
	c	95	83	47	39	30	

Tabelle XI: Es wurden in jeweils einem Plasma (aktiviert mit 50 E SK pro ml Plasma) nacheinander mehrere Fibrinpapiere (Nr. 1 - 6) für jeweils 15 min inkubiert. Vorwässerung und Wässerung wie üblich. Bei einigen Fibrinpapieren (x) wurde vor dem Einlegen noch 150 E SK zum Ansatz gegeben. Beim letzten Plasma bedeuten a: Aktivierung mit 10 E SK/ml Plasma, b: 50 E SK/ml, c: 300 E SK/ml.

Es verhalten sich, offenbar unabhängig vom Ergebnis des Streptokinase-resistenztestes (SK-R-Test), die Plasmen in ihrer "Erschöpfbarkeit" ver-

schieden: während ein Teil auch bei der 3. Inkubation praktisch unverändert gleich hohe Lysequoten zeigt, hat man bei anderen Plasmen den Eindruck einer deutlichen Abnahme der Lysequoten.

Besonders interessant ist das Verhalten der 3 ersten Plasmen aus Tabelle XI, wo nach nochmaligem SK-Zusatz die Plasmen eine deutlich erneut ansteigende lytische Aktivität zeigen. Dies läßt den Schluß zu, daß die primär verwendete SK-Menge nicht ausreicht, alles Plasminogen in Plasmin zu überführen.

c) Die Lysequoten bei Verdünnungen des bereits aktivierten Plasmas.

Es werden hier z. T. auch die Ergebnisse des Streptokinaseresistenztestes mit angeführt, um festzustellen, ob die mit dem SK-R. Test nachgewiesenen Hemmkörper auch bei der Papierfibrinolyse einen Einfluß nehmen.

Herstellung der Verdünnungsreihen: 15 ml Zitratplasma werden zuerst mit 15 ml Veronalpuffer (p_H 7,3) verdünnt, in welchem schon die jeweilige SK-Menge (10; 50 oder 300 E/ml Plasma) gelöst enthalten ist; diese 3 verschiedenen Plasmaansätze enthalten nun insgesamt 150; 750 oder 4 500 E SK. Dazu werden dann mit Veronalpuffer Reihen geometrisch ansteigender Verdünnung bis maximal einer Verdünnung von 1 : 512 hergestellt.

In den Ansätzen dieser Verdünnungsreihen wurde die fibrinolytische Aktivität an Fibrinpapierfolien gleichartiger Präparation geprüft. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 2 - 4 (Anhang) dargestellt. Es erweist sich, daß mit zunehmender Verdünnung des aktivierten Plasmas die Lysequote abnimmt.

Es zeigen sich auch deutliche Unterschiede in den Verdünnungsreihen verschiedener Plasmen.

In Abb. 4 ist die Abnahme der Lysequote einer Verdünnungsreihe (c) dargestellt, bei der jede Verdünnungsstufe erst im verdünnten Zustand mit je 1 000 E SK aktiviert wurde (Ausgangsmenge 8 ml Plasma + 24 ml Puffer = Verdünnung von 1 : 4).

Rechnet man hier die SK-Menge auf 1 ml Plasma um, kommen in der Verdünnung 1 : 4 auf 1 ml Plasma 250 E SK, in der letzten Verdünnungsstufe (1 : 512) auf 1 ml Plasma 32 000 E SK, was einen großen SK-Überschuß bedeutet.

Nebenbei untersuchten wir noch, welchen Einfluß eine Aufbewahrung des Zitratplasmas bei -20° C auf das fibrinolytische Potential hat. Das Plasma wurde einmal im Standardansatz am Tage der Abnahme untersucht, der Rest dann im Eisschrank bei -20° C eingefroren und nach verschiedenen Zeiten: 1; 3 oder 10 Tagen später wieder vorsichtig (!) aufgetaut und nochmals im Standardansatz untersucht.

Lysequoten in %
bei frisch abgenommenen Blut (1) und nach Aufbewahrung
bei -20°C (2)

Plasma	bei 3 Tagen Aufbewahrung		Plasma	bei 10 Tagen Aufbewahrung	
	1 (a)	2		1 (b)	2
1	7 , 16	16	9	57 , 51	70
2	72 , 72	73	10	53 , 57	73
3	40 , 43	65	11	57 , 57	74
4	48 , 49	50	12	28 , 32	34
5	30 , 31	34 , 37	13	54 , 56	60
6	81 , 82	85	14	51 , 52	61
7	71 , 75	71 , 73	15	16 , 21	27
8	23 , 27	33	16	19 , 21	22

Tabelle XII: In 2 Versuchsreihen (a u. b) wurde von verschiedenen Plasmen einmal ein Teil am Tage der Blutabnahme getestet (1), der Rest bei -20°C im Eisschrank eingefroren und in Reihe (a) nach 3 Tagen, in Reihe (b) nach 10 Tagen nochmals getestet (2). Die Lyseergebnisse wurden nur z.T. durch die Aufbewahrung bei -20°C im Sinne einer Lysesteigerung beeinflusst.

Tabelle XII zeigt die Ergebnisse: es ergeben sich nur bei längerer Aufbewahrung (Tab. XII b) deutliche Unterschiede - generell ein Anstieg der Lysequote, was vermutlich auf eine Beeinflussung der Inhibitoren zurückzuführen ist.

B) Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Papierfibrinolyse, der Lebensalter und einigen klinischen Befunden der Probanden

- 1) Vergleich der Ergebnisse der Papierfibrinolyse mit denen
 - a) des Streptokinase-Resistenz-Testes (SK-R-Test)
 - b) des Spontanfibrinolyseansatzes
- 2) Beziehungen zu den Ergebnissen weiterer Blutuntersuchungen:
 - a) der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS)
 - b) des Gesamteiweißgehaltes des Serums
 - c) den Fraktionen der Serumproteine bei der Papierelektrophorese,
 - d) des Gesamtcholesteringehaltes des Serums.
- 3) Lysequoten bei verschiedenen Erkrankungen.

Von 202 Patienten wurde das Plasma bei einer SK-Aktivierung mit 50 E SK/ml Plasma und von 85 Patienten das Plasma noch bei der jetzt verlassenen SK-Aktivierung mit 10 E SK/ml Plasma untersucht.

1a) Vergleich der Ergebnisse der Papierfibrinolyse mit den Ergebnissen des Streptokinaseresistenztestes (SK-R-Test). Mit dem SK-R-Test wird der Antistreptokinasegehalt eines Plasmas bestimmt; dieser Antistreptokinasegehalt soll z.B. (41) durch Streptokokkeninfekte erhöht werden; in einigen wenigen Fällen fanden wir bei erhöhtem SK-R-Test-Ergebnis Tonsillitiden oder grippale Infekte, während meist bei erhöhtem SK-R-Test-Ergebnis klinisch kein Anhalt für einen floriden oder abgelaufenen Streptokokkeninfekt gegeben war.

Uns interessierte nun, ob sich die Lysequoten der SK-aktivierten Papierfibrinolyse entsprechend dem im SK-R-Test gefundenen Antistreptokinasegehalt verhalten.

In Abb. 5 (Anhang) haben wir die durchschnittlichen Lysequoten von Probandengruppen mit gleichem SK-R-Test-Ergebnis aufgetragen. Bei den 153 Untersuchungen mit dem modifizierten SK-R-Test wurde der mit 50 E SK/ml Plasma aktivierte Ansatz der Papierfibrinolyse benutzt; während bei 48 Untersuchungen mit dem Original-SK-R-Test (nach Fletcher, aus 39) der mit 10 E SK pro ml Plasma aktivierte ursprüngliche Ansatz benutzt wurde. Wie oben erwähnt, entsprechen die Plasma-SK-Werte (1 : 10 verdünnt = unsere Modifikation des SK-R-Testes) den Ergebnissen des Original-Fletcher-Testes mit Zitratvollblut.

Beide Ansätze der Papierfibrinolyse mit 10 und mit 50 E SK-Aktivierung pro ml Plasma zeigen gleichlautend eine deutlich verminderte Lysequote bei zunehmender SK-Resistenz; der Abfall ist bei dem 50-E-Ansatz jedoch deutlich geringer, was dafür spricht, daß die 5-fache SK-Menge erst bei höheren Inhibitorpotentialen in ihrer Aktivität meßbar reduziert wird - dies scheint ein Beweis für die Stöchiometrie der Reaktion zu sein.

Die Abb. 6 (Anhang) zeigt jedoch, daß die Lysequoten der Papierfibrinolyse innerhalb einer Gruppe mit gleichem Ergebnis im SK-R-Test recht verschieden sind, d.h., daß bei etwa proportionalem Verhalten des Gesamtkollektivs die einzelnen Probandenwerte innerhalb einer Gruppe mit gleichem SK-R-Test jedoch deutlich differieren können; daraus ist ersichtlich, daß unsere Papierfibrinolysemethode durchaus in der Lage ist, unabhängig vom Ergebnis des SK-R-Testes verschiedenes Plasminogenaktivierungsvermögen der Probandenplasmen aufzuzeigen.

1b) Vergleich der Ergebnisse der Papierfibrinolyse mit den Ergebnissen des Spontanfibrinolyseansatzes.

Von den 202 Probandenplasmen, die mit dem "50 E SK-Standard-Papierfibrinolyse-Ansatz" untersucht wurden, wurde bei 119 gleichzeitig ein Spontanfibrinolyseansatz durchgeführt. Auffallend ist hier, daß bei den 26 Totallysen und 17 fast totalen Lysen bei der Spontanfibrinolyse die dazugehörigen Lysequoten der Papierfibrinolyse nur in einem Fall (mit 20 % Lyse) unter 50 % Lyse lagen, alle anderen aber gleich oder höher als 50 % Lyse lagen (Abb. 7, (Anhang)).

Bei den 76 Plasmen, die keine Spontanfibrinolyse aufwiesen, lagen die Papierfibrinolysequoten zwischen 5 und 100 %; Beziehungen zwischen dem Ergebnis des SK-R-Testes und dem des Spontanfibrinolyseansatzes bestehen offenbar nicht. Die Verteilung der Lysequoten innerhalb einzelner Patientengruppen zeigt die Abb. 8 (Anhang): hier soll die erhebliche Streuung der Lysequoten innerhalb einzelner Probandengruppen demonstriert werden. Gleichzeitig werden hier die Lysequoten gesunder Versuchspersonen denen von Patienten mit obliterierenden Angiopathien, Infekten (der Luftwege), Magenulcera oder Herzinsuffizienz gegenübergestellt. Überraschenderweise findet sich bei den gesunden Versuchspersonen die niedrigste durchschnittliche Lysequote.

Aus Abb. 9 (Anhang) ersieht man, daß die Lysequoten (aufgetragen als Durchschnittswerte) keine Abhängigkeit vom Lebensalter erkennen lassen.

- 2) Beziehungen der Ergebnisse der Papierfibrinolyse zu Veränderungen:
 - a) der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
 - b) des Serum - Gesamteiweißes
 - c) der alpha (1 und 2) oder der gamma-Fraktion der Serumproteine
 - d) des Cholesteringehaltes des Blutserums, Tabelle XIII.

Art der Veränderungen	50 E SK/ml Plasma			10 E SK/ml Plasma		
	Anzahl	Alter	Lyse%	Anzahl	Alter	Lyse%
BKS 1. Stunde						
0 - 15 mm	125	50	65	54	52	46
16 - 25 mm	18	57	79	6	65	63
26 - 45 mm	3	63	92	2	46	57
über 45 mm	5	51	71	-	-	-
Gesamteiweiß						
6 - 8 g%	70	54	74	29	56	50
über 8 g%	7	58	63	11	59	57
Elektrophorese						
alpha 1 u. 2						
bis 16 Rel. %	49	53	69	26	56	56
16 - 20 Rel. %	19	53	76	12	61	60
gamma						
unter 22 Rel. %	56	53	76	29	63	56
22 - 30 Rel. %	16	56	69	10	59	44
Cholesterin						
unter 300 mg %	40	60	70	26	63	55
über 300 mg %	14	60	79	7	63	60

Tabelle XIII: Die Lysequoten wurden nach Gruppen von Veränderungen der BKS oder der Serumzusammensetzung geordnet, z. T. wurden dabei Lysequoten von denselben Probanden in verschiedenen Gruppen, also mehrmals, mitgerechnet. Zu den einzelnen Gruppen wurden die Mittelwerte der Lyse% und der Lebensalter errechnet. Es wurden 2 Ansätze benutzt: 1) das Plasma wurde 1 : 12 mit Veronalpuffer (p_H : 7,3) verdünnt und mit 50 E SK/ml Plasma aktiviert. 2) das Plasma wurde 1 : 6,3 mit isotonischer NaCl-Lösung (p_H 5,5) verdünnt und mit 10 E SK/ml Plasma aktiviert.

Der geringe Unterschied der durchschnittlichen Lysequoten zwischen den verschiedenen Gruppen in Tabelle XIII ist sicher z. T. darauf zurückzuführen, daß ein und dasselbe Lyseergebnis in verschiedenen Gruppen auftaucht.

Auffallend ist eigentlich nur die durchschnittliche Lysequote von 92 % bei 3 Fällen mit einer BKS von 26 - 45 mm in der ersten Stunde (Hauptdiagnosen: je 1 x Polyarthrit, obliterierende Angiopathie, Leberschaden)-.

Auffallend ist auch die sogar etwas gesteigerte Lysequote bei Erhöhung des Gesamtcholesterins über 300 mg % gegenüber der fast gleichen Lysequote

bei einem Cholesteringehalt des Plasmas unter 300 mg %.

Veränderungen in den Serumeiweißfraktionen der alpha - und gamma - Globuline scheinen auf die Lysequote keinen Einfluß zu nehmen.

3) Durchschnittliche Lysequoten bei verschiedenen Krankheitsgruppen:

Krankheits- gruppen	50 E SK/ml Plasma			10 E SK/ml Plasma		
	Anzahl	Alter	Lyse%	Anzahl	Alter	Lyse%
1) Gesunde VP	53	43	55	17	29	28
2) Arterielle Obliterationen	43	59	73	23	65	53
3) Infekte (Bronchitis Tonsillitis, Grippe)	23	40	69	4	56	46
4) Ulcera im Magen- Darmbereich	21	39	70	9	46	59
5) Herzinsuffizienz	13	62	79	9	57	38
6) Hypertonie	9	61	71	5	53	33
7) Polyarthritiden	5	62	75	2	70	75
8) chron. Leberschäden	6	42	73	-	-	-
9) Prostataadenome	3	71	88	1	72	80

Tabelle XIV: Von verschiedenen Krankheitsgruppen wurden die durchschnittlichen Lebensalter und Lysequoten errechnet und zusammengestellt. Auch hier wurden wie bei Tabelle XIII Ergebnisse zweier Ansätze benutzt.

Bei den in Tabelle XIV zusammengestellten Ergebnissen fällt vor allem auf, daß - oft in Widerspruch zu den Angaben in der Literatur - bei allen hier angeführten Krankheitsgruppen, auch bei angiographisch gesicherten obliterierenden Angiopathien, die Lysequote gegenüber Gesunden erhöht ist - Erklärungsmöglichkeiten werden später diskutiert.

DISKUSSION

Die in der Medizinischen Poliklinik der Universität München inaugurierte neue Fibrinolyse-Nachweismethode die "Papierfibrinolyse", wies trotz der zahlreichen Vorversuche (Müller, 96) noch einige methodische Mängel und Unklarheiten auf, die es zu beseitigen galt.

Zunächst konnten wir durch Verbesserung der Technik bei der Imprägnierung des Elektrophoresepapieres mit Fibrin wesentlich gleichmäßigere Ergebnisse bei Doppelbestimmungen erzielen: während sich früher eine durchschnittliche Differenz zwischen den Einzelwerten einer Doppelbestimmung von 8 % Lyse fand, konnte diese Streuung nun auf durchschnittlich 4 % Lysequotendifferenz gesenkt werden. - Eine noch bessere Standardisierung wäre nur bei industrieller Herstellung des Fibrinpapieres denkbar. Bei trockener Aufbewahrung in einem Exsiccator mit CaCl_2 ist die "Haltbarkeit" der Streifen bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Fibrinolysefaktoren erheblich (Tab. IV).

Zur Imprägnierung unseres Papiers verwendeten wir Rinderfibrinogen "Behring".

Verschiedene Autoren (97, 127, 129) weisen darauf hin, daß die Verwendung von Rinderfibrinogen wegen seines hohen Gehaltes an Plasminogen zum Nachweis fibrinolytischer Aktivität in menschlichen Plasmen nur bedingt geeignet sei, da der im menschlichen Plasma vorhandene Aktivator dieses Plasminogen in Plasmin umwandeln könne, was zu falschen Schlüssen hinsichtlich der Lyseergebnisse führen müsse.

Rinderfibrinogen wird deshalb nur als geeignet für den Nachweis der Aktivatorgehaltes angesehen, aber nicht zum Nachweis des Plasminogen- oder Plasmingehaltes des Humanplasmas.

Lassen (88) versuchte durch Erhitzung des Fibrins (Fibrinplatten) auf 90°C für 30 - 45 min, das Plasminogen zu denaturieren.

Er fand dabei einen "Aktivitätsverlust" der Platten bis zu 90 %. Er führt diesen "Aktivitätsverlust" auf die Inaktivierung des Plasminogens im Fibrin zurück und leugnet eine Strukturveränderung des Fibrins und damit eine Veränderung seiner Empfindlichkeit gegenüber Plasmin.

Deutsch (37) und Stamm (133) dagegen beschreiben eine Denaturierung des Fibrins durch Erhitzung, die sich auch in einer abnehmenden Empfindlichkeit gegenüber Fermenten widerspiegelt.

Wir fanden bei einer Erhitzung der Fibrinpapiere auf 90°C für 30 min nur einen relativ geringen Empfindlichkeitsverlust gegenüber fibrinolytischen Fermenten.

Nach Angaben der Herstellerfirma des Rinderfibrinogens - Behring - Werke - soll der Plasminogengehalt des Fibrinogens sehr gering sein, was den geringen Empfindlichkeitsverlust (Aktivitätsverlust) erklären könnte. - Unsere Ergebnisse

würden dann aber weiter bedeuten, daß bei unserer Methode die Erhitzung keine wesentliche Beeinflussung der Empfindlichkeit des Fibrins gegenüber der Fibrinolyse darstellt.

Möglich wäre auch, daß die Erhitzung nicht zu einer weiteren Denaturierung des Plasminogens oder Fibrins führt, weil beide Substanzen im Papier im getrockneten Zustand vorliegen.

Man könnte dann die deutlichen Lysequoten bei unseren Versuchen mit hohen Verdünnungen (bis 1 : 512) leicht dadurch erklären, daß der im Humanplasma in großem Überschuß vorhandene Aktivator (14, 98) das im Fibrinpapier vorhandene Plasminogen aktiviert. Wenn wir jedoch die Lysequote auf das im Testplasma vorhandene Plasminogen zurückführen wollen, müßte auch unter Berücksichtigung einer eventuellen Verdünnung von Inhibitoren (22, 115) Plasminogen in erheblichen Mengen vorhanden sein.

Doch die Lösung dieser Frage überschreitet den Rahmen dieser Arbeit und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Wir modifizierten auch den von Müller (96) verwendeten Ansatz, in dem bei einer Verdünnung des Plasmas von 1 : 6,3 mit isotonischer NaCl-Lösung zur Aktivierung 10 E SK pro ml Plasma benutzt wurden.

Als erstes wurde die isotonische NaCl-Lösung (p_H 5,5 - 6,0) durch Veronalpuffer (0,05 m und mit einem p_H von 7,3) ersetzt, weil wir einen physiologischen p_H -Bereich bei unseren Versuchsansätzen haben wollten.

Gleichzeitig wurde die Plasmaverdünnung von 1 : 6,3 auf 1 : 12 erhöht: Verdünnungen zwischen 1 : 10 und 1 : 20 sollen für den Fibrinolyse nachweis am günstigsten sein (27), wobei durch die Verdünnung die Inhibitoren weitgehend ausgeschaltet werden sollen (22, 115). Weiter wurde die SK-Menge zur Aktivierung des Plasmas von 10 E SK auf 50 E SK pro ml Plasma erhöht.

Wir kamen mit der höheren Menge von 50 E SK/ml Plasma in einen besseren Standardbereich, da wir bei dieser SK-Menge keine sogenannten negativen Lyseergebnisse mehr erhielten wie mit den 10 E SK/ml Plasma.

Diese negativen Ergebnisse zeichneten sich dadurch aus, daß das Fibrinpapier nach der Inkubation in aktivierter Plasmaverdünnung nicht weniger Amidoschwarz aufnahm, was eine Lyse angezeigt hätte, sondern im Gegenteil mehr Farbstoff aufnahm.

Diese vermehrte Farbstoffaufnahme ist eigentlich nur durch eine stabile Plasma-protein-Adsorption an das Fibrinpapier trotz guter Wässerung zu erklären - die Farbstoffaufnahme soll ja proportional dem Proteingehalt sein (61).

Die Menge von 50 E SK/ml Plasma ist auch willkürlich gewählt. Wir wollten Ergebnisse aus einer größeren Anzahl gleichartiger und vergleichbarer Ansätze haben, um einige Anhaltspunkte über die Aussagefähigkeit unserer Methode zu erhalten.

Maximal ist die Aktivierung mit 50 E SK/ml Plasma nicht, wie die Ergebnisse

der Tabelle X und der Abbildung 1 zeigen.

Ein besonderes Problem stellt die Wässerung der Fibrinpapiere nach der Inkubation in aktiver Plasmapverdünnung dar.

Die Vorwässerung (15 min) in fließendem Leitungswasser soll nur mechanisch den oberflächlich anhaftenden Film von Plasmaproteinen entfernen.

Die Anschließende Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung über 20 - 22 Stunden wurde anfangs für notwendig erachtet, um adsorbierte Plasmaproteine und Bruchstücke gelösten Fibrins aus dem Papier zu entfernen. - Unsere jetzigen Untersuchungen zeigen aber, daß offensichtlich der Abbau von Fibrin während dieser Wässerung andauert.

Dabei können wahrscheinlich die während der Inkubation an die fibrinüberzogenen Papierfasern adsorbierten Fibrinolysefaktoren in der NaCl-Lösung sozusagen im "gereinigteren System" zur Wirkung kommen. - Es wird von verschiedenen Autoren (8, 11, 41, 128) eine derartige Adsorption von Fibrinolysefaktoren beschrieben, und auch die fortdauernde Wirkung adsorbierter Faktoren in reiner gepufferter NaCl-Lösung erwähnt (82).

Die Adsorption wird in unserem Falle natürlich durch die große Oberfläche des in dünner Schicht an die einzelnen Papierfasern adsorbierten Fibrins noch begünstigt.

Wir fanden eine deutliche Abhängigkeit der Lysequoten von der Dauer der Wässerung in physiologischer NaCl-Lösung (Tab. V). Es war deshalb anzunehmen, daß die Fibrinolyse bei der Wässerung andauert. Wir suchten nun das fibrinolytische Ferment nach der Inkubation dadurch zu inaktivieren, daß wir einmal die Papiere vor der Wässerung in isotonischer NaCl-Lösung mit dem Aktivator- und Plasminantidot epsilon-Aminocaprinsäure (eACS) behandelten, zum anderen die Fibrinpapiere nach der Inkubation bei 5° C wässerten.

Wir fanden in beiden Fällen deutlich niedrigere Lysequoten gegenüber Papieren, die nach der Inkubation einfach bei 22° C in isotonischer NaCl-Lösung gewässert wurden (Tab. VII + IX). Das spricht dafür, daß hier der fermentative Abbau von Fibrin unterbunden wurde - bekanntlich reagieren Fermente temperaturabhängig, und es ist nachgewiesen, daß die eACS sowohl die Bildung von Aktivatoren durch SK als auch - in höheren Dosen - die Plasminwirkung selbst hemmt (41, 104, 122).

Nach Deutsch (41) soll eACS in einer Konzentration von 6,5 mg/ml die Aktivatoraktivität gänzlich hemmen, und in einer Konzentration von 8 mg/ml auch Plasmin hemmen. Sawyer (122) gibt die gleiche Wirkung schon bei niedrigeren Konzentrationen an.

Wir verwendeten eine Konzentration von 10 mg eACS pro ml NaCl-Lösung, in die die Fibrinpapiere für 10 min erst nach der Inkubation in aktiviertem Plasma kamen. Wir fanden hierbei eine deutliche Hemmwirkung der eACS (Tab. VIII und IX) - es wurde hier sicher auch Plasmin inaktiviert.

Der Zusatz von eACS direkt zum Inkubationsansatz bewirkte bei uns keine Hemmung der Fibrinolyse - wahrscheinlich wurde hier aber bei der nachfolgenden Vorwässerung die eACS schon wieder restlos entfernt, während im ersten Falle die Papiere nach der Vorwässerung mit eACS behandelt wurden.

Wenn diese Versuche auch beweisen, daß der größte Teil des Fibrins erst während der langen Wässerungszeit aus dem Papier gelöst wird, so deutet doch ein informativer Versuch mit einer Aktivierung durch 500 E SK pro ml Plasma (Tab. VI) an, daß weitere größere Versuchsreihen mit hoher Streptokinaseaktivierung und nur kurzer anschließender Wässerung sehr aussichtsreich sein könnten, da man dabei schon deutliche Lysequoten erhält, und die Imponderabilien des langen Wässerungsprozesses wenigstens zum Teil ausgeschaltet werden können.

Die Empfindlichkeit unserer neuen Methode ist erfreulich hoch, was daraus ersichtlich ist, daß sich bei der Testung von Plasmen in Verdünnungsreihen trotz Verwendung gleicher SK-Mengen zur Aktivierung deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Plasmen zeigen und sich auch noch bei hohen Verdünnungsstufen, wie 1 : 128; 1 : 256; 1 : 512 deutliche Lysequoten erzielen lassen. Außerdem ergeben sich bei relativ geringen Aktivierungsunterschieden (SK-Einheiten) doch deutliche Unterschiede in den Lysequoten (Abb. 1).

Die Genauigkeit der Methode zeigt sich in den weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen bei Doppel- und Mehrfachbestimmungen (Tabelle I und II).

Die Eignung der Papierfibrinolyse für klinische Belange wird von uns augenblicklich noch eingehend geprüft.

Die bisher gewonnenen Ergebnisse (Tabelle XIII und XIV und Abb. 8) scheinen zum Teil bisherigen Beobachtungen, die allerdings mit anderen Methoden gemacht wurden, zu widersprechen.

So wird vielfach bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen eine verminderte Fibrinolyse beschrieben (96, 122, 129). Sandberg, Tsitouris und Bellet (119) und Czarniecki (34) führen dabei die verminderte Fibrinolyse auf einen erhöhten Antiplasmingehalt zurück. Wir fanden nun bei Patienten mit angiographisch gesicherten arteriellen Obliterationen eine höhere durchschnittliche Lysequote als bei gesunden Vergleichspersonen.

Das kann vielleicht damit erklärt werden, daß die SK-Aktivierung gemeinsam mit der Plasmaverdünnung (22, 115) und der großen Angriffsfläche Voraussetzungen schafft, durch die das Antiplasmin mehr als bei anderen Methoden ausgeschaltet wird. Aber hier sind für eine endgültige Klärung eingehendere Untersuchungen nötig.

Die Untersuchung einer großen Anzahl von Probanden mit verschiedenen Erkrankungen sollte informativ zeigen, daß dabei erheblich differente Lyseer-

gebnisse zu erzielen sind.

Die außer den Patienten mit peripheren arteriellen Obliterationen untersuchten Krankheitsgruppen sind zahlenmäßig zu gering, um daraus weitgehende Schlüsse hinsichtlich des fibrinolytischen Potentials zu ziehen.

Die in Abbildung 8 demonstrierte große Streuung innerhalb gleicher Gruppen von Probanden wird auch von anderen Untersuchern bei anderen Methoden beschrieben (42, 69, 147).

Eine Abhängigkeit der Lysequote vom Alter konnten wir mit unserer Methode nicht feststellen (Abb. 9), während Müller (96) bei Jugendlichen eindeutig häufiger Spontanlysen fand als bei Älteren: hier ist sicher der unterschiedliche Aktivierungsmechanismus des fibrinolytischen Systems von Bedeutung.

Zu unseren Untersuchungen der Lysequoten bei Veränderungen der BKS, des Serumgesamtweißes und der alpha (1 und 2)- und gamma-Fraktion bei der Papierelektrophorese fehlen in der Literatur Vergleichsmöglichkeiten.

Bei erhöhter alpha-Fraktion, in der ja die Antiplasmin zu finden sein sollen (106, 107) fanden wir keine verminderte durchschnittliche Lysequoten, was im Einklang stünde zu unserer oben geäußerten Ansicht, daß bei unserer Versuchsanordnung im besonderen Maße die Inhibitoren ausgeschaltet werden.

Ebenso wie Hougie und Ayers (73) fanden wir keine Beziehung zwischen dem Gesamtcholesteringehalt des Blutserums und unseren Lysequoten, während Mitchell und Briers (94) - allerdings bei invitro-Zusatz - eine signifikante Hemmung der Fibrinolyse durch Cholesterinoleate, die 86 % des Gesamtcholesterins ausmachen, fanden.

Die gleichzeitige Untersuchung von 119 Plasmen mit 1) dem Spontanfibrinolyseansatz, 2) dem Papierfibrinolyseansatz und 3) dem Streptokinaseresistenztest (Abb. 7) ergab keinen Anhalt für eine eindeutige Beziehung zwischen den Ergebnissen der ersten beiden Untersuchungen, was wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Aktivierungsmechanismus zurückzuführen ist (110).

Wir fanden dagegen eine gewisse Beziehung zwischen den Ergebnissen des Streptokinaseresistenztestes (SK-R-Test) und der Papierfibrinolyse (Abb. 5 und 6).

Verschiedene Plasmen, die zwar übereinstimmende Ergebnisse im SK-R-Test aufweisen, differieren in ihren Lysequoten des Papierfibrinolyseansatzes doch recht erheblich. - Doch lassen die Durchschnittswerte dieser Gruppen von Plasmen mit gleichem SK-R-Test gewisse Beziehungen zu den Ergebnissen des SK-R-Testes erkennen: so nimmt die Durchschnittslysequote mit der Zunahme der im SK-R-Test zur Lyse notwendigen SK-E-Menge ab. Die Abnahme erfolgt um so schneller, je geringer die im Papierfibrinolyseansatz verwendete SK-E-Menge ist (Abb. 5).

Groß (65) ist der Ansicht, daß im SK-R-Test nicht nur die Antistreptokinase (ASK), sondern auch das Antiplasmin bestimmt wird. Norman (106) ist ganz ent-

sprechend der Ansicht, daß Inhibitoren trotz der schnellen Wirksamkeit der SK die Ausbildung der vollen proteolytischen Aktivität vermindern.

Bei dem SK-R-Test werden alle Inhibitoren mit in das entstehende Gerinnsel eingeschlossen und können dort wahrscheinlich wirksam werden - bei der Papierfibrinolyse wird vielleicht gerade das Antiplasmin mehr ausgeschaltet, weil es ja nicht an das Fibrin adsorbiert wird (3), während das Fibrinpapier mit seiner großen Oberfläche das Plasmin leicht adsorbieren kann, wobei das Fibrin sogar noch die Fähigkeit haben soll, das Plasmin aus dem Plasmin-Antiplasmin-Komplex (mit dem schnell wirksamem Antiplasmin) zu lösen und zu adsorbieren (7, 31, 106). - Auf diese Weise könnten vielleicht die hohen Papierfibrinolysequoten bei einem hohen SK-R-Test-Ergebnis erklärt werden, während die niedrigen Lysequoten auf einen hohen Antistreptokinasegehalt beruhen könnten oder tatsächlich auf einem verminderten fibrinolytischen Potential.

Auch bei unserer Methode messen wir, wie es auch bei anderen Methoden der Fall ist, nur einen standardisierten Ausschnitt eines fermentativen Vorganges: es spielen, wie unsere Untersuchungen gezeigt haben (Tabelle V, VI, XI und Abb. 1) die Menge der zugesetzten SK, die Zeit der Einwirkung des aktivierten und adsorbierten fibrinolytischen Fermentes (Inkubations- und Wässerungszeit) und die Menge des für die Lyse zur Verfügung stehenden Fibrins eine Rolle.

Gegenüber anderen Methoden hat die Papierfibrinolyse wohl den Vorteil, auf eine verhältnismäßig einfache Weise - der photometrischen Bestimmung des Restfibrins in der Papierfolie, ähnlich der Auswertung bei der Papierelektrophorese - recht exakte Angaben über die fibrinolytische Aktivität einer Testflüssigkeit zu liefern. Dabei sind subjektive Fehlermöglichkeiten bei der Auswertung weitgehend ausgeschaltet.

Das auch in vielen anderen Methoden als Testsubstrat zur Anwendung gelangen - de Rinderfibrin ist bei unserer Methode in dünner Schicht an Papierfasern adsorbiert: es bietet dem Plasmin somit eine große, und auch, entsprechend einer Forderung von v. Kaulla an präformierte Gerinnsel (82), eine definierte Oberfläche zur Einwirkung.

Ständige Konzentrationsänderungen an der Oberfläche durch verflüssigtes Substrat, die v. Kaulla bei der Fibrinplattenmethode als Fehlermöglichkeit angeführt hat (82) werden bei uns durch wiederholtes Bewegen der Inkubationsflüssigkeit ausgeschlossen.

Die Papierfibrinolyse ermöglicht es, auch in stark verdünnten Testflüssigkeiten Fibrin als Testsubstrat zu verwenden.

Wir haben gegenüber sonst verwendeten präformierten Gerinnseln den Vorteil, eine große und weitgehend definierte Fibrinoberfläche den Fibrinolysefaktoren aussetzen zu können.

Die hier angeführten Untersuchungen sollen klarmachen, daß diese neue Metho-

de, Fibrin an eine Papierfolie adsorbiert als Testsubstrat für die Fibrinolyse zu benutzen, auf eine relativ einfache Art quantitative, reproduzierbare Aussagen über die fibrinolytische Aktivität ermöglicht.

Es lassen sich über viele Fragen, wie die Fibrinolyse in diesem Testsystem nun eigentlich abläuft, nur Vermutungen äußern. Das liegt aber daran, daß der Mechanismus des fibrinolytischen Systems in einigen grundlegenden Fragen eben noch nicht ganz geklärt ist. Und das liegt sehr wahrscheinlich daran, daß die meisten Nachweismethoden entweder sehr kompliziert sind oder aber nur grobe Ja - Nein - Aussagen liefern.

Wir glauben, mit dieser Methode eine einfache Möglichkeit geliefert zu haben, über fibrinolytische Aktivität einer Testflüssigkeit quantitative Aussagen zu machen. - Dabei kann die Methode je nach Bedarf hinsichtlich Aktivierung, Substratverdünnung, Inkubationsdauer etc. leicht modifiziert werden und so vielleicht bei dem steigenden klinischen Interesse, das fibrinolytischen Vorgängen entgegengebracht wird, eine nützliche Hilfe sein.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Nach ausführlicher Darstellung der methodischen Probleme wird aufgrund eigener Untersuchungen die Papierfibrinolysemethode auf Fehlerquellen untersucht und weiter verbessert.

Prinzip: An Elektrophoresepapier adsorbiertes Fibrin wird 15 min in einem mit Veronalpuffer (pH 7,3) 1 : 12 verdünnten Plasma, das mit 50 E SK/ml Plasma aktiviert wurde, inkubiert.

Anschließend werden die Papierfolien 15 min in fließendem Leitungswasser vorgewässert und dann 20 - 22 Stunden in isotonischer NaCl-Lösung weitergewässert. Nach Lufttrocknung und Färbung der Folien mit Amidoschwarz 10 B wird das Restfibrin in den Folien photometrisch bestimmt.

ERGEBNISSE

- 1) Die Normalbereiche (2s-Grenzen) liegen für die Extinktionswerte
 - a) innerhalb eines Streifens des reinen Fibrinpapieres zwischen $\pm 2 \%$ und $\pm 6 \%$,
 - b) innerhalb eines Streifens des 22 Stunden in isotonischer NaCl gewässerten Fibrinpapieres bei $\pm 6 \%$,
 - c) der Vollwerte aller Streifen jeweils einer Fibrinpapiercharge zwischen $\pm 9 \%$ und $\pm 16 \%$,
 - d) für fünf Lysewerte eines Streifens aus fünf Ansätzen mit demselben Plasma: $\pm 9 \%$ - bezogen auf den Mittelwert der 5 Lysewerte; $\pm 4 \%$ - bezogen auf den Vollwert des Streifens.Das arithmetische Mittel der Differenz von 382 Doppelbestimmungen beträgt 3,6-Lyse %, Variationsbreite 0 - 12 Lyse %, die mittlere Differenz nimmt mit abnehmender Lyse zu.
- 2) Die Lysewerte sind mit der Papierfibrinolysemethode nach mehreren Tagen reproduzierbar, wenn das Zitratplasma in der Zwischenzeit bei $-20^{\circ}C$ eingefroren war.
- 3) Die Lyseergebnisse sind abhängig von der zur Aktivierung benutzten SK-Meng: steigende Lysequoten bei steigenden SK-Mengen; bei 300 E SK/ml Plasma scheint eine Grenze der Steigerungsmöglichkeit zu liegen.
- 4) Die Lysequoten sind abhängig von den Wässerungszeiten, denen die Fibrinpapiere nach der Inkubation ausgesetzt werden, besonders bei schwacher lytischer Aktivität.

Außerdem sind die Lysequoten abhängig von der Temperatur bei der Wässerung.

- 5) Werden die Fibrinpapierfolien nach der Inkubation für 10 min in eine eACS-Lösung von 10 mg/ml getaucht, so wird die sonst bei der Wässerung weiterlaufende Fibrinolyse gehemmt.
- 6) Die Lysequote nimmt bei steigender Verdünnung des Plasmas ab, gleichgültig, ob das Plasma mit großen oder kleinen Mengen SK aktiviert wurde. Die Verdünnungsreihen verschiedener Plasmen zeigen deutliche Unterschiede in der lytischen Aktivität.
- 7) Die Lysequote der Papierfibrinolyse gibt nur einen Teil des fibrinolytischen Potentials an.
- 8) Veränderungen der BKS, des Gesamteiweißes des Serums, der alpha-(1 und 2)- und der gamma-Globulinfraktion in der Papierelektrophorese der Serumproteine sowie des Gesamtcholesteringehaltes zeigen keine eindeutige Beeinflussung der Lysequoten.
- 9) Die durchschnittlichen Lysequoten zeigen bei einer erheblichen Streuung der Einzelwerte in fast gleicher Weise eine Erhöhung der Lyse gegenüber gesunden Vergleichspersonen bei arteriellen Obliterationen, Infektionen der Luftwege, bei Ulcera im Magen-Darmbereich, bei Herzinsuffizienzen, Hypertonie, bei Leberschäden und bei Polyarthritiden; eine stärkere Erhöhung zeigt sich bei Prostatahypertrophie.
- 10) Bei einer Altersaufteilung ergibt sich eine unregelmäßige Verteilung der durchschnittlichen Lysequoten in den einzelnen Altersgruppen.
- 11) Ein Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Spontanfibrinolyse und denen der Papierfibrinolyse besteht nur insofern, als bei den 43 Lysen von 119 Ansätzen der Spontanfibrinolyse bei den Papierfibrinolyseansätzen mit den gleichen Plasmen nur 2 Lysequoten unter 50 % Lyse lagen, während bei den 76 negativen Spontanlyseergebnissen die entsprechenden Papierfibrinolysequoten zwischen 5 und 100 % Lyse liegen.
- 12) Ein gewisser Zusammenhang zwischen den Ergebnissen des SK-R-Testes und denen der Papierfibrinolyse zeigt sich nur in den Mittelwerten der Lysequoten der 8 Gruppen von Plasmen mit gleichem SK-R-Test. Innerhalb der Gruppen differieren die Lysequoten unabhängig vom Ergebnis des SK-R-Testes jedoch erheblich.

In der Diskussion wird unter Berücksichtigung anderer Autoren eine Deutung der Ergebnisse versucht.

L I T E R A T U R A N G A B E N

- 1) Abe, T. und Deutsch, E. : Einfluß von Ionenaustauschern auf die durch Streptokinase induzierte fibrinolytische Aktivität.
Wien.Z.inn.Med. 40 : 52 (1959)
- 2) Ablondi, F.B. ; Hagan, J.J. : Inhibition of plasmin, trypsin and the streptokinase-activated fibrinolytic system by epsilon-Aminocaproic Acid.
Phillipps, M. und de Renzo, F.S. Arch.Biochem. 82 : 153 (1959)
- 3) Ablondi, F.B. und de Renzo, F.S. : Mechanism of clot lysis by streptokinase and effects of epsilon-Aminocaproic Acid.
Proc.Soc.exp.Biol.N.Y. 102 : 717 (1959)
- 4) Albrechtsen, O.K. : The fibrinolytic activity of human tissues
Brit.J.Haemat. 3 : 284 (1957)
- 5) Alkjaersig, N. ; Fletcher, A.P. und Sherry, S. : The activation of human Plasminogen
I) Spontaneous activation in Glycerol
II) A kinetic study of activation with Trypsin, Urokinase and Streptokinase.
J.biol.Chem. 233 81 (1958)
- 6) Alkjaersig, N. ; Fletcher A.P. und Sherry, S. : The mechanism of clot dissolution by Plasmin.
J.clin.Invest. 38 : 1086 (1959)
- 7) Ambrus, C.M. ; Back, N. und Ambrus, J.L. : Fibrinolytic effect of Plasmin-Antiplasmin complex.
Fed.Proc. 19 : 58 (1960/I)
- 8) Amery, A. ; Vermeylen, J. ; Maes, H. und Verstraete, M. : Enhancing the fibrinolytic activity in human blood by occlusion of blood vessels
Thromb.Diath.Haemorrhagic.
Vol. VII, Nr. 1/2 : 70 (1962)
- 9) Astrup, T. und Müllertz, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.
Arch.Biochem. 40 : 346 (1952)

- 10) Astrup, T. : a) Fibrinolysis and Thrombolysis
b) Recent developments in fibrinolysis.
Thrombose und Embolie, Referate der 1.
internationalen Tagung, Basel 1954
Benno Schwabe Verlag, Basel 1955
- 11) - - : The biological significance of fibrinolysis.
Lancet : 1956/II : 565
- 12) - - : Neuere Aspekte in der Blutgerinnung und
der Fibrinolyse und ihre Beziehungen zur
Koronarthrombose und Koronarsklerose.
Wien. Z. inn. Med. : 39/8 : 373 (1958)
- 13) - - und Sterndorff, J. : The effects of Sodium Citrate and an ex-
cess of Plasminogen on fibrinolytic agents
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. IV, No 3/4 : 462 (1960)
- 14) Auerswald, W. und : Zur Frage der artifiziellen Aktivierung des
Doleschl, W. fibrinolytischen Systems.
Wien. Klin. Wschr. 26 : 463 (1961)
- 15) Back, N. ; Ambrus, J. L. : Study on the effect of Streptokinase
Simpson, C. L. und activated Plasmin on clots in various
Shulman, S. stages of organisation.
J. clin. Invest. : 37 : 864 (1958)
- 16) Back, N. ; Ambrus, J. L. : Fate of J^{131} -labeled components of the
und Markus, G. fibrinolysis system.
Fed. Proc. 18 : 364 (1959)
- 17) Baumgarten, W. und : Human Plasminogen-Streptokinase complex.
Cole, R. B. The question of the existence of a sepa-
rate activator entity.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. V, No 3/4 : 605 (1961)
Ninth Annual Symposium on Blood, Jan.
1961
- 18) Bayerle, H. und : Über Fermenteffectoren der Fibrinolyse.
Kammenhuber, K. Bedeutung der Erythrozyten für die Fibrin-
olyse.
Blut, Band IV : 78 (1958)

- 19) Beller, F.K. und Reinhardt, U. : Untersuchungen über die Inaktivierung von streptokinaseaktiviertem Plasmin. Blut, Band IV : 367 (1958)
- 20) - - , - - : im Druck 1959 (aus Stamm, 133)
- 21) - - und Glas, P. : Inhibition of clotting as the result of Plasminogen activation by Streptokinase: II: Analytical studies of the clotting mechanism. Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. IV, No. 3/4 : 520 (1960)
- 22) - - , - - : The activation of Plasminogen by Urokinase in comparison with previous observations made with Streptokinase. Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. V, No. 3/4 : 531 (1961)
- 23) Bickford, A.F. jr. und Sokolow, M. : Fibrinolysis as related to the Urea solubility of Fibrin. Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. V, No. 3/4 : 480 (1961)
- 24) Bierstedt, P. : a) Das Gewebe als Quelle der fibrinolytischen Aktivität der Körperflüssigkeiten.
b) Körpergewebe als Quelle fibrinolytischer Aktivität des Blutes und anderer Körperflüssigkeiten. Thrombose und Embolie:
1. Internationale Tagung, Basel 1954.
Benno Schwabe, Basel 1955, a): 99
b) : 102
- 25) - - : Beziehungen des fermentativen Fibrinabbaues zur Fibrinreifung. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 305 : 158 (1956)
- 26) - - : Über die Beteiligung der Thrombozyten an der Fibrinolyse Z. ges. exp. Med. 129 : 164 (1957)

- 27) Billimoria, J. D. ; : Determination of fibrinolytic activity of
Drysedale, J. ; James, D. C. O. whole blood with special reference to the
und MacLagan, N. F. effects of exercise and fat-feedings.
Lancet 1959/II : 471

- 28) Buckell, M. : The effect of Citrate on Euglobulin
methods of estimating fibrinolytic activity.
J.clin.Path. 11 : 403 (1958)

- 29) - - und Truscott, M. : Salt concentration and fibrinolytic acti-
vity.
Nature : 183 : 1268 (1959)

- 30) - - und Elliott, F. A. : Diurnal fluctuation of plasma fibrinolytic
activity in normal males.
Lancet 1959/II : 660

- 31) Celander, D. R. und : Factors influencing susceptibility of
Guest, M. M. Fibrin and Fibrinogen to proteolysis by
Fibrinolysin.
Arch.Biochem. 72 : 176 (1957)

- 32) Christensen, L. R. : Methods for measuring the activity of com-
ponents of the streptococcale fibrinolytic
system.
J.clin.Invest. 28 : 163 (1949)

- 33) Copley, A. L. ; Niewiarowski, : A micromethod of euglobulin fibrinolysis
S. und Marechal, J. in plasma of human subjects and small
laboratory animals.
J.Lab.clin.Med. 53 : 468 (1959)

- 34) Czarniecki, W. : Fibrinolytic activity of blood in
Intermittend Claudication (Mitteilung)
Lancet 1960/I : 289

- 35) Davies, M. C. und : Physical properties of highly purified
Englert, M. E. human Plasminogen.
J.biol.Chem. : Vol. 235, No. 4 : 1011
(1960)

- 36) Dausset, J. ; Bergerot- : Hemagglutination passive des hématies
Blondel, Y. und Collin, M. tannées et recouvertes d'une substance
plasmatisque présente dans la fraction I et
ses rapports avec la fibrinolyse du caillot.
Vox Sang. 1 : (1956)

- 37) Deutsch, E. : Blutgerinnungsfaktoren; Einzeldarstellungen aus der Biochemie I
Verlag Fr. Deuticke, Wien 1955
- 38) - - ; Elsner, P. und Kratochwil, : Über die Wirkung bakterieller Pyrogene unter besonderer Berücksichtigung der Fibrinolyse.
Wien, Klin. Wschr. 71/32 : 586 (1959)
- 39) - - und Fischer, M. : Die Wirkung intravenös applizierter Streptokinase auf Blutgerinnung und Fibrinolyse Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. IV, No. 3/4 : 482 (1960)
- 40) - - und Elsner, P. : Pyrogenes as thrombolytic agents. Clinical and experimental studies.
Amer. J. Cardiology : 6 : 420 (1960)
- 41) - - : Fortschritte der fibrinolytischen Therapie. Blut, Band VII : 472 (1961)
- 42) Donner, L. : Einfluß der Dicumarolpräparate auf die Fibrinolyse.
Schweiz. med. Wschr. : 44 : 1254 (1960)
- 43) Doleschl, W. und Auerswald, W. : On the behaviour of a human serum proactivator reacting with Streptokinase during artificial activation of the fibrinolytic system.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. VI, No. 4/5 : 498 (1961)
- 44) Eichenberger, E. ; Kickhöfen, B. ; Schmidhauser-Kopp, M. und Schöholz, G. : Über die fibrinolytische Wirkung von Thrombin
Schweiz. med. Wschr. : 84 : 65 (1954/I)
- 45) Elsner, P. : Fibrinolyse in Schwangerschaft und Geburt
Fortschr. Geburtsh. Gynäk. 6 : 1 (1957)
- 46) Fearnly, G. R. : Fibrinolysis by adsorption
Nature 172 : 544 (1953)
- 47) - - und Lackner, R. : The fibrinolytic activity of normal blood.
Brit. J. Haemat. 1955/I : 189

- 48) Fearnly, G.R. ;
Balmforth, G. und
Fearnly, E. : Evidence of a diurnal fibrinolytic rhythm:
with a simple method of measuring natural
fibrinolysis. Clin. Sci. 16 : 645 (1957)
- 49) - - : Arteriovenous difference in natural fibri-
nolysis.
Lancet : 1957/II : 1040
- 50) - - ; Vincent, C.T. und
Chakrabarti, R. : Reduction of blood fibrinolytic activity
in Diabetes mellitus by Insulin.
Lancet : 1959/II : 1067
- 51) - - ; Ferguson, J. ; Chakra -
barti, R. und Vincent, C.T. : A concept of natural fibrinolysis.
Lancet : 1961/I : 992
- 52) Ferguson, J. und Lewis : Studies on a proteolytic enzyme system of
the blood : II Fibrinolysokinase activators
for Profibrinolysis.
J. clin. Invest. : 29 : 1059 (1950)
- 53) Fischbacher, W. : Beitrag zur fibrinolytischen Therapie mit
Streptokinase und Fibrinolysin.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. VI, No. 4/5 : 547 (1961)
- 54) Fletcher, A. P. ;
Alkjaersig, N. und
Sherry, S. : Laboratory methods. Assay of thrombolytic
("fibrinolytic") mixtures intended for
therapeutic use.
J. Lab. clin. Med.
Vol. 57, No. 4 : 620 (1961)
- *55) Fonio, A. : Neuere Untersuchungen über die physiologi-
schen fibrinolytischen Vorgänge in vitro.
Schweiz. med. Wschr. 44 : 1243 (1960)
- 56) - - : Über die Kontrolle der Wirkung fibrinoly-
tischer Präparate.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. VI, No. 2/3 : 339 (1961)
- 57) Gerbeck, Cl. ; Koppel, J. L.
und Olevin, J. H. : Effects of certain Phospholipids on Plasmi-
nogen activation and Plasmin activity.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. VII, No. 1/2 : 16 (1962)

- 58) Gerdes, K. und Maurer, W. : Messungen zur Lebensdauer von Fibrinogen beim Menschen und beim Kaninchen. Biochem. Z. 328 : 522 (1957)
- 59) Gillmann, Th. ; Naidoo, S.S. : Plasma-fibrinogen activity in pregnancy. und Hathorn, M. Lancet : 1959/II : 70
- 60) Glas, P. und Beller, F.K. : Inhibition of clotting as the result of Plasminogen activation by Streptokinase. I: Studies of the inactivation of Fibrinogen. Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. IV. No. 3/4 : 507 (1960)
- 61) Graßmann, W. und Hannig, K. : Ein quantitatives Verfahren zur Analyse der Serumproteine durch Papierelektrophorese. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 290 : 1 (1952)
- 62) - - , - - : Beiträge zur Methode der papierelektrophoretischen Serumanalyse. Klin. Wschr. 32 : 35/36 : 838 (1954)
- 63) Greigh, H.B.W. : Inhibition of fibrinolysis by alimentary Lipaemia. Lancet : 1956/II : 16
- 64) - - und Runde, J.A. : Studies on the inhibition of fibrinolysis by lipids. Lancet : 1957/II : 461
- 65) Gross, R. ; Hartl, W. ; Kloss, G. und Rahn, B. : Thrombolyse durch Infusionen hochgereinigter Streptokinase. Erfahrungen und Untersuchungen an den ersten 50 Kranken. Dtsch. med. Wschr. 85/49 : 2119 (1960)
- 66) Guest, M.M. : Profibrinolysin, Antifibrinolysin, Fibrinogen and urine fibrinolytic factors in the human subject. J. clin. Invest. 33 : 1553 (1954)
- 67) Halse, Th. : Über die vegetativen Regulationen der Fibrinolyse Schweiz. med. Wschr. 14 : 411 (1947)

- 68) Halse, Th. : Eine colorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung der Fibrinolyse für klinische Serienuntersuchungen.
Klin. Wschr. 27 : 13/14 : 226 (1949)
- 69) - - : Das fibrinolytische Potential.
Medizinische : 50 : 2044 (1958/II)
- 70) - - : Fibrin, Fibrinolyse und Arteriosklerose.
Medizinische : 33/34 : 1662 (1960)
- 71) Hartert, H. : Thrombelastographie
Z. ges. exp. Med. 117 : 189 (1951)
- 72) Hörder, M. H. und Kickhöfen, B. : Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis der Fibrinolyse nach Injektion eines bakteriellen Lipopolysaccharids (Pyrexal).
Acta Haemat. 17 : 321 (1957)
- 73) Hougie, C. und Ayers, Fl. : Lipaemia and fibrinolytic potentiality.
Lancet : 1960/I : 186
- 74) Innerfield, J. ; Shub, H. und Boyd, L. J. : Bucally administered Streptokinase.
New Eng. J. Med. 258 : 1069 (1958)
- 75) Johnson, A. J. und MacCarty, W. R. : Some aspects of the mechanism of thrombolysis.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. V, No. 3/4 : 391 (1961)
- 76) Jürgens, J. : Die klinische Bedeutung fibrinolytischer Vorgänge.
Dtsch. med. Wschr. 84, 51 : 2285 (1959)
- 77) - - und Beller, F. K. : Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalysen.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1959
- 78) - - und Weidemann, R. : Nephelometrische Bestimmungen des Fibrinogens und der Fibrinolyse. Im Druck 1959.
- 79) Katshuhiro, F. ; Keiji, Sh. und Toyome, A. : Analysis of fibrinolysis by the use of epsilon-Aminocaproic Acid: Preliminary report.
Blood, 15 : 690 (1960)

- 80) v. Kaulla, K. N. : Autoaktivierung und Autofibrinolyse. Eine einfache Schnellmethode zur Gewinnung hochaktiven menschlichen fibrinolytischen Materials.
Klin. Wschr. 35 : 667 (1957)
- 81) - - und McDonald, S. T. : The effects of Heparin on components of the human fibrinolytic system.
Blood 13 : 811 (1958)
- 82) - - : Die Rolle des Aktivators beim Abbau menschlicher Fibringerinnung (Erste Ergebnisse mit einer neuen Einheitstechnik)
Klin. Wschr. 38, 6 : 288 (1960)
- 83) Kautzsch, E. und Rauscher, A. : Kolorimetrische Fibrinolysebestimmung mittels des Tyrosinäquivalentes.
Klin. Wschr. 28 : 39/40 : 694 (1950)
- 84) Kline, D. L. : The purification and crystallisation of Plasminogen (Profibrinolysin).
J. biol. Chem. 204 : 949 (1953)
- 85) Koller, F. : Fibrinolyse
Schweiz. med. Wschr. 44 : 1233 (1960)
- 86) Kommerell, B. und Berger, H. D. : Untersuchungen zur Gerinnungsaktivität und Fibrinolyse bei alimentärer Lipämie.
Klin. Wschr. 19 : 1029 (1959)
- 87) Lackner, H. und Merskey, C. : Fibrinolysis after acute myocardial infarction and after the administration of oral anticoagulant drugs and intravenous Heparin.
Sth. afr. med. J. 33 : 936 (1959)
- 88) Lassen, M. : Heat denaturation of Plasminogen in the fibrin plate method.
Acta physiol. scand. 27 : 371 (1952)
- 89) Loomis, E. C. ; George, Ch. Jr. und Ryder, A. : Fibrinolysin: nomenclature, unit, assay preparation and properties.
Arch. Biochem. 121 : 1 (1947)

- 90) Macfarlane, R. G. : Fibrinolysis following operations.
Lancet : 232/1 : 10 (1937)
- 91) Macfarlane, R. G. und Biggs, R. : Fibrinolysis, its mechanism and significance.
Blood III/10 : 1167 (1948)
- 92) Marbet, R. : Fibrinolyse - Probleme.
Arch. Gynäk. 189 : 522 (1956)
- 93) Marx, R. : Über einige Ergebnisse und Probleme klinisch-enzymologischer Fibrinolysestudien.
Blut I : 275 (1955)
- 94) Mitchell, J. R. A. und Briers, Sh. M. : Effect of Cholesterol, Cholesterolesters and neutral fats on fibrinolysis.
Lancet 1959/II : 435
- 95) Müller, K. H. : Erste erfolge mit hochgereinigter Streptokinase zur Thrombolyse in der Chirurgie.
Bruns Beitr. klin. Chir. 202 : 3 (1961)
- 96) Müller, R. : Fibrinolyse und arterielle Obliteration.
med. Diss. (München 1962).
- 97) Müllertz, S. und Lassen, M. : An activator system in blood indispensable for formation of Plasmin by Streptokinase.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. : 82 : 264 (1953)
- 98) - - , - - : A Plasminogen activator in spontaneously active human blood.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. : 82 : 291 (1953)
- 99) - - a) : Components interacting in the formation of Plasminogen activator in human blood.
b) : The Plasmin activator system in human blood
Thrombose und Embolie : Referate der ersten internationalen Tagung, Basel 1954, Benno Schwabe - Verlag, Basel 1955
- 100) Murray, M. : The distribution of fibrinolytic and profibrinolytic activity in the plasma of patients with various disease entities.
Amer. J. clin. Path.
Vol. 31, No. 2 : 107 (1959)

- 101) Nestel, P.J. : Fibrinolytic activity of the blood in Intermittent Claudication.
Lancet 1959/II : 373
- 102) de Nicola, P. und Mazetti, G. M. : Analysis of the Streptokinase activated Fibrinolysin by means of Thrombelastography.
Blut III : 20 (1957)
- 103) - - und Soardi, F. : Fibrinolysis in liver disease - study of 109 cases by means of the Fibrin-plate-method.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. II, No. 3/4 : 290 (1958)
- 104) - - , - - und Gibelli, A. ; Die antifibrinolytische Wirkung der epsilon-Aminocapronsäure.
Schweiz. med. Wschr. 44 : 1256 (1960)
- 105) Nolf, P. : Contribution à l' étude de la coagulation du sang : la fibrinolyse.
Arch. int. Physiol. : 6 : 306 (1908)
- 106) Norman, Ph. S. : Studies of the Plasmin system
II : Inhibition of Plasmin by serum or plasma.
J. exp. Med. 108 : 53 (1958)
- 107) - - und Hill, B. M. : Studies of the Plasmin system
III : Physical properties of the two Plasmin inhibitors in plasma.
J. exp. Med. : 108 : 639 (1958)
- 108) - - : Some aspects of the chemistry of Plasmin and its inhibitors.
Amer. J. Cardiology : 6 : 390 (1960)
- 109) Olesen, E. S. : A fibrinolytic system in human plasma activated by Peptone or acid polysaccharides.
Scand. J. clin. Lab. Invest. : 13/3 : 410 (1960)

- 110) Olesen, E. S. : Fibrinolytic activity produced in Guinea-pig serum by some human body fluids and by hyaluronic acid.
Scand.J.clin.Lab.Invest. 13/1 : 37 (1961)
- 111) Permin, M. : Properties of the Fibrinokinase-Fibrinolysin system.
Nature, Lond. 160 : 571 (1947)
- 112) Phillips, L. L. und Skrodelis, V. : The fibrinolytic enzyme system in normal, haemorrhagic and disease states.
J.clin.Invest. 37 : 965 (1958)
- 113) Ratnoff, O. D. : Studies on a proteolytic enzyme of fibrinolysis.
J.exp.Med. 88, 401 : 53 (1948)
- 114) - - und Colopy, J. : Studies on a proteolytic enzyme in human plasma: IX : Fibrinogen and Fibrin as substrates for the proteolytic enzyme of plasma.
J.clin.Invest. 32 : 473 (1953)
- 115) - - und Donaldson, V. H. : Physiologic and pathologic effects of increased fibrinolytic activity in man; with notes on the effects of exercise and certain inhibitors on fibrinolysis.
Amer.J.Cardiology 1960/VI : 378
- 116) Remde, W. : Verstärkte Fibrinolyse als Ausdruck immunbiologischer Reaktionen.
Kongreß inn. Med. Kongreßband 65 : 401 (1959)
- 117) Remmert, L. F. und Cohen, P. P. : Partial purification and properties of a proteolytic enzyme in human serum.
J.biol.Chem. 181 : 431 (1949)
- 118) Rybak, M. und Rejnek, J. : The Antiplasmin effect of plasma fractions
Clin.chim.Acta 4 : 364 (1959)
- 119) Sandberg; Tsitouris, G. und Bellet : Experiences with inhibitors to the plasmin-plasminogen system in the human subject (their modification by thrombolysin-therapy)
Amer.J.Cardiology 6 : 432 (1960)

- 120) Sawyer, W. D. ; Alkjaersig N. ; Fletcher, A. P. und Sherry, S. : Qualitative differences between the action of various Plasminogen activators on human plasma and on Fibrin clots. Fed. Proc. 19/I : 57 (1960)
- 121) --, --, --, --, : A comparison of fibrinolytic and fibrinolytic effects of Plasminogen activators and proteolytic enzymes in plasma Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. V, No 2 : 149 (1960)
- 122) - - ; Fletcher, A. P. ; Alkjaersig, N. und Sherry, S. : Studies on the thrombolytic activity of human plasma. J. clin. Invest. 39/I : 426 (1960)
- 123) Schmidhauser-Kopp, M. und Eichenberger, E. : Über den Einfluß von Thrombin und Heparin auf die Fibrinolyse. Separat. Experientia Vol. VIII/9 : 354 (1952)
- 124) Schröer, H. und Merz, H. P. : Thrombinaktivität und Fibrinolyse. Z. Biol. 109 : 332 (1957)
- 125) Scott, R. F. und Thomas, W. A. : Methods for comparing effects of various fats on fibrinolysis. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 96 : 24 (1957)
- 126) Seegers, W. H. : Thrombin. E as a fibrinolytic enzyme. Science 131 : 726 (1960)
- 127) Sherry, S. : The fibrinolytic activity of Streptokinase activated human Plasmin. J. clin. Invest. 33 : 1054 (1954)
- 128) - - und Alkjaersig, N. : Studies on the fibrinolytic enzyme of human plasma. Thromb. Diath. Haemorrhagic. Vol. I, No. 2 : 264 (1957)
- 129) - - ; Fletcher, A. P. und Alkjaersig, N. : Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. Physiol. Rev. 39 : 343 (1959)

- 130) Shulman, S. ; Alkjaersig, N. und Sherry, S. : Physiochemical studies on human Plasminogen (Profibrinolysin) and Plasmin (Fibrinolysin).
J. biol. Chem. 233 : 91 (1958)
- 131) - - und Rifé, U. : Preliminary studies on the N-terminal aminoacids of human Plasminogen.
Thromb. Diath. Haemorrhagic.
Vol. V, No. 3/4 : 396 (1961)
- 132) Sjoerdsma, A. und Nilsson, J. M. : Aliphatic amino compounds as inhibitors of Plasminogen activation.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103 : 533 (1960)
- 133) Stamm, H. : Einführung in die Klinik der Fibrinolyse
Verlag S. Karger, Basel 1962
- 134) Tagnon, H. J. ; Davidson, Ch. S. und Taylor, F. H. : Studies on blood coagulation : a proteolytic enzyme prepared from Calcium and plateletfree normal human blood plasma.
J. clin. Invest. 21 : 525 (1942)
- 135) Tillet, W. S. und Garner, R. L. : The fibrinolytic activity of hemolytic Streptococci.
J. exp. Med. 58 : 485 (1933)
- 136) Todd, A. S. : Fibrinolysis Autographs.
Nature, Lond. 181 : 495 (1958)
- 137) Troll, W. ; Sherry, S. und Wachman, J. : The action of Plasmin on synthetic substrates.
J. biol. Chem. 208 : 85 (1954)
- 138) Troll, W. und Sherry, S. : The activation of human Plasminogen by Streptokinase.
J. biol. Chem. 213 : 881 (1955)
- 139) Villavicencio, J. L. und Warren, R. : Clinical determination of fibrinolytic activity.
Arch. Surg. Chicago : 78 : 145/639 (1959)
- 140) Vinazzer, H. : Untersuchungen über die fibrinolytische Wirkung des Heparins.
Wien. Z. inn. Med. 4, 32 : 167 (1951)

- 141) de Vries, S.J. ; Braat-van Straaten, M.A.J. ; Müller E. und Wettermark, M. : Antiplasmin deficiency in Polycythemia, a form of thrombopathy. Thromb.Diath.Haemorrhagic. Vol. VI, No. 4/5 : 445 (1961)
- 142) Walcher, A. und Goossens, N. : Fibrinolyse-Untersuchungen bei Patienten mit obliterierender Angiopathie. VIII.Kongreß der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie. Wien 1961 (im Druck).
- 143) Wallner, A. : Normalwerte und Methodenfehler bei der Papierelektrophorese. Med.Mschr. 1955/8 : 520
- 144) Walther, S. und Winter, K. A. : Untersuchungen über Gerinnungsfähigkeit und Fibrinolyse bei serösen Exsudaten. Z.ges.inn.Méd. 7 : 706 (1952/II)
- 145) Weiner, W. : Lability of Fibrinolysin Nature, Lond. 184 : 1937 (1959)
- 146) Witte, S. und Dimberger, P. : Die Bestimmung der Profibrinolysinzeit. Klin.Wschr. 32 : 133 (1954)
- 147) - - , - - : Über die Verlängerung der Profibrinolysinzeit bei Leberkrankheiten. Klin.Wschr. 33 : 931 (1955)
- 148) Macfarlane, R.G. und Biggs, R. : Observations on fibrinolysis: spontaneous activity associated with surgical operations, trauma etc. Lancet Vol. II, No. 24 : 862 (1946)
- 149) Johnson, J. F. und Seegers, W. : Techniques in blood coagulation used at Wayne University, Detroit; Michigan 1st June 1953 (aus 133)
- 150) v.Kaulla, K.N. und Schultz, R. L. : Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Amer.J.clin.Path. 29 : 1041 (1958).

ANHANG MIT ABBILDUNGEN

ABHÄNGIGKEIT DER PAPIERFIBRINOLYSEQUOTE VON
DER STREPTOKINASEKONZENTRATION
IM INKUBATIONSANSATZ

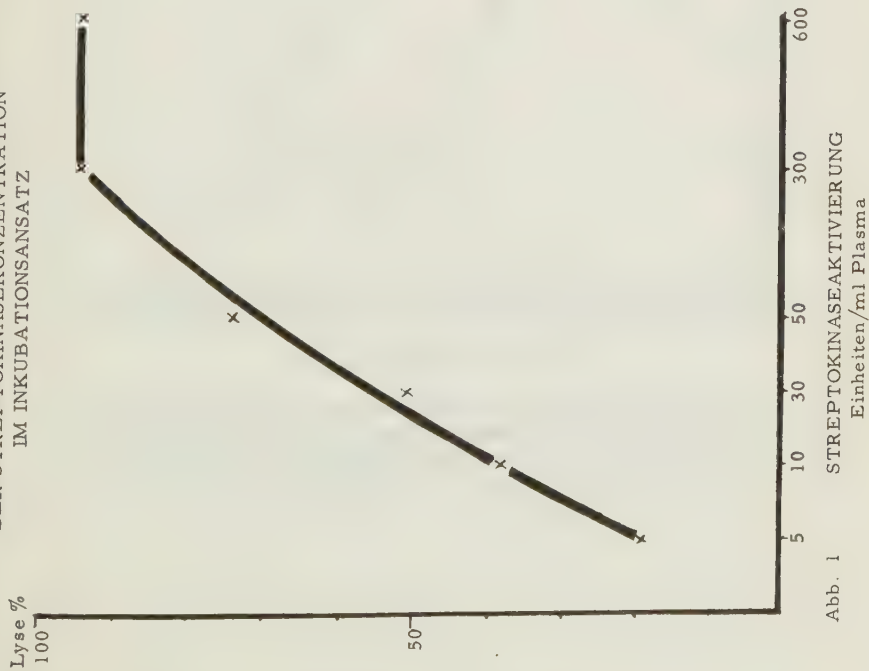


Abb. 1

ABHÄNGIGKEIT DER FIBRINOLYSEQUOTE
VON DER VERDÜNNUNG DES PLASMAS

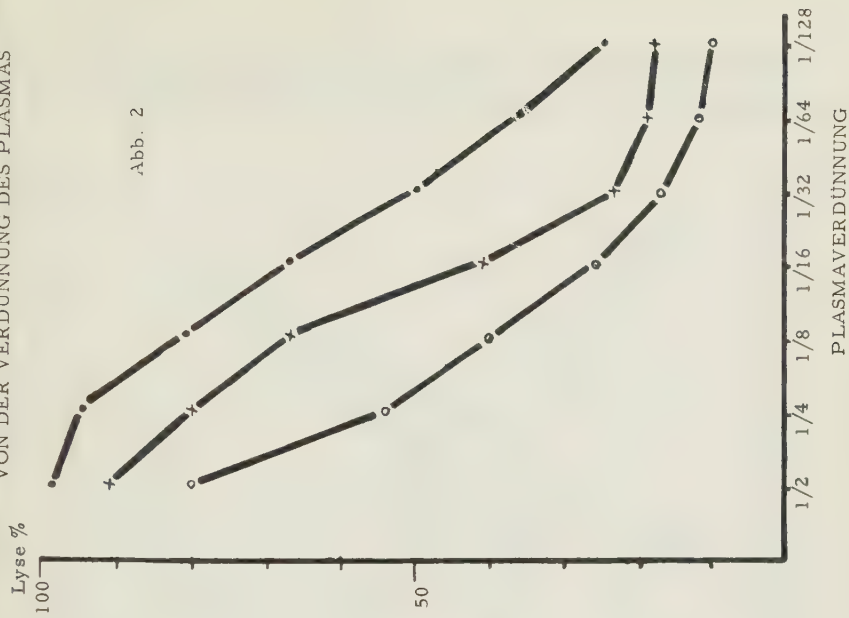


Abb. 2

Abb. 2: Die Abhängigkeit der Fibrinolysequote von der Verdünnung des Plasmas wird an 3 verschiedenen mit 50E SK/ml aktivierten Plasmen dargestellt.

ABHÄNGIGKEIT DER FIBRINOLYSEQUOTE VON DER VERDÜNNUNG
DES PLASMAS UND DER ZUR AKTIVIERUNG VERWENDETEN SK-MENGE

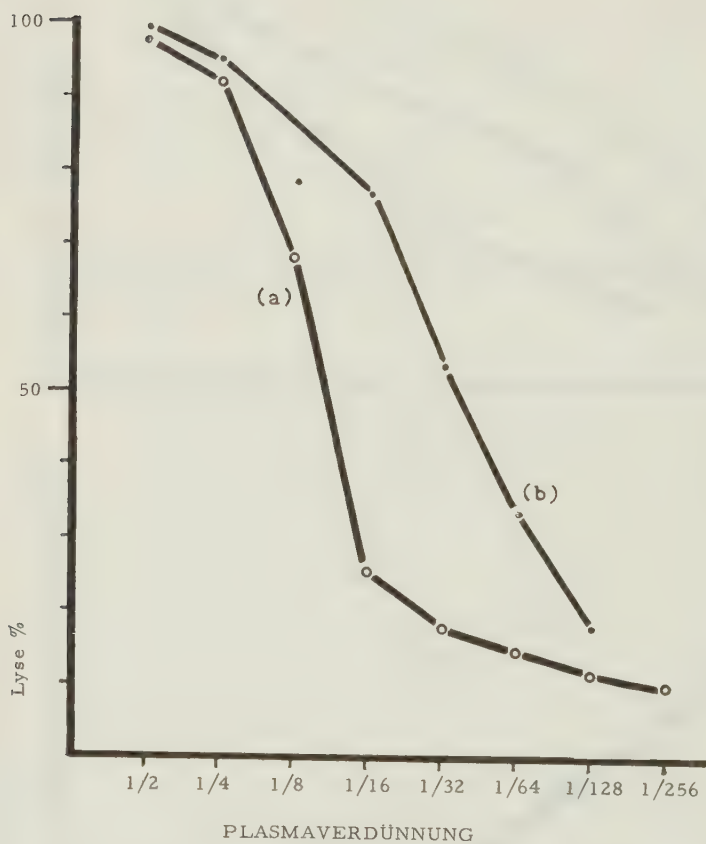


Abb. 3: von einem Plasma wurden 2 Verdünnungsreihen hergestellt; die eine Reihe (a) wurde mit 10E SK/ml Plasma, die andere (b) mit 50 E SK/ml Plasma vor der Verdünnung aktiviert.

ABHÄNGIGKEIT DER FIBRINOLYSEQUOTE VON DER VERDÜNNUNG
DES PLASMAS UND DER ZUR AKTIVIERUNG VERWENDETEN SK-MENGE

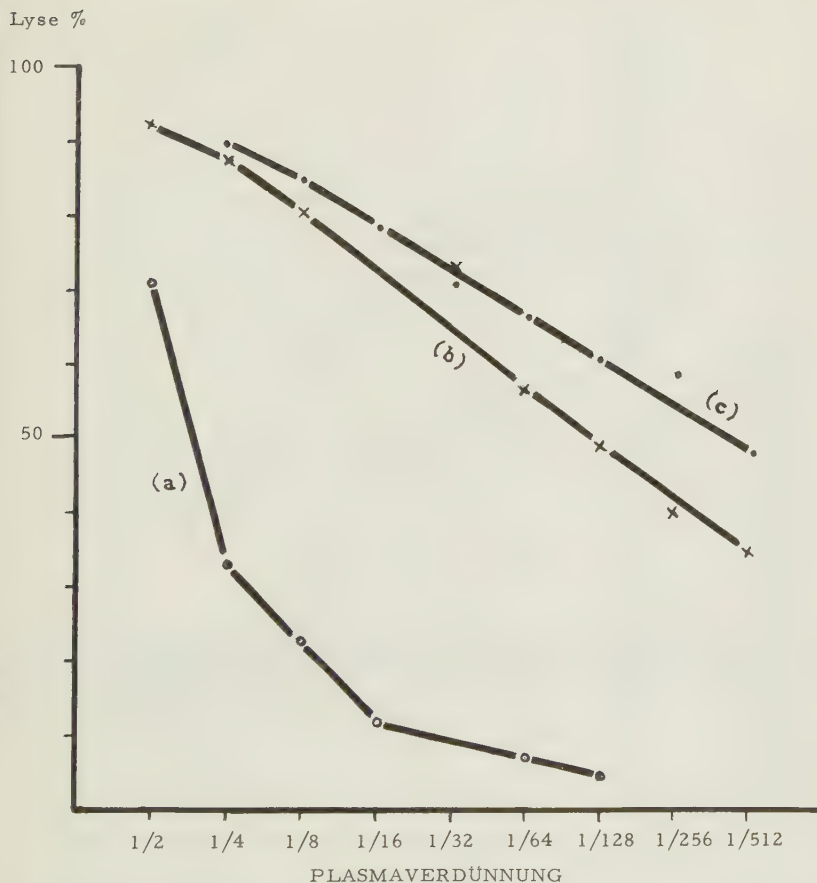


Abb. 4: von einem Plasma wurden 3 Verdünnungsreihen hergestellt, 2 davon wurden vor der Verdünnung mit SK aktiviert, und zwar (a) mit 10E/ml Plasma und (b) mit 300E/ml Plasma. Die Reihe (c) wurde erst nach der Verdünnung mit je 1000E SK pro Verdünnungsstufe aktiviert.

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN STREPTOKINASERESISTENZTEST UND PAPIERFIBRINOLYSE

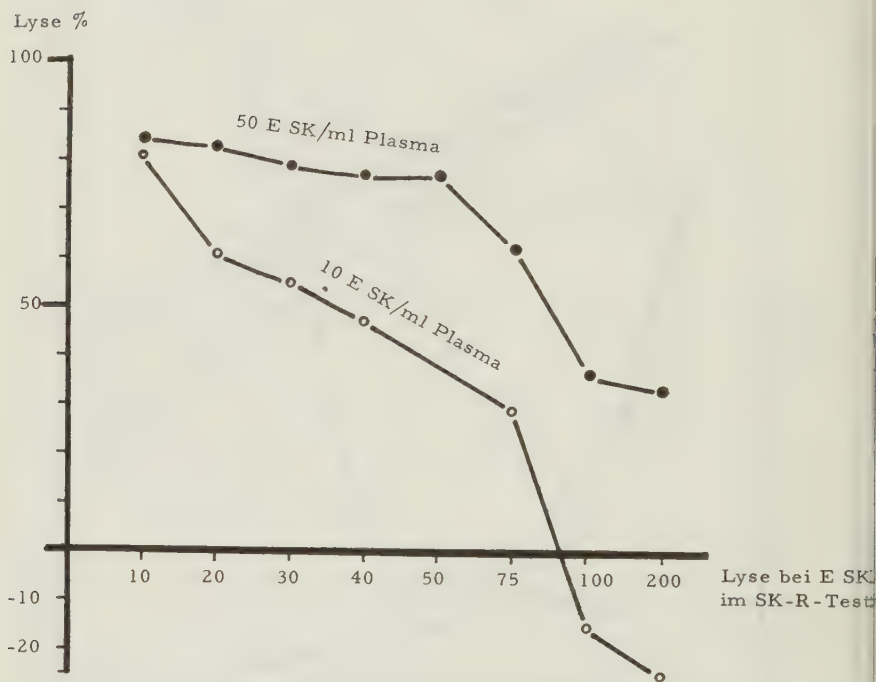


Abb. 5: die Plasmen wurden nach ihrem Ergebnis im Streptokinaseresistenztest zu Gruppen zusammengestellt. Zu diesen Gruppen wurde dann die durchschnittliche Lysequote der mit diesen Plasmen erreichten Papierfibrinolyse errechnet und gegen den entsprechenden Wert des Streptokinaseresistenztestes (SK-R-Test) aufgetragen.

STREUUNG DER LYSEQUOTEN IN GRUPPEN MIT GLEICHEM STREPTOKINASE -

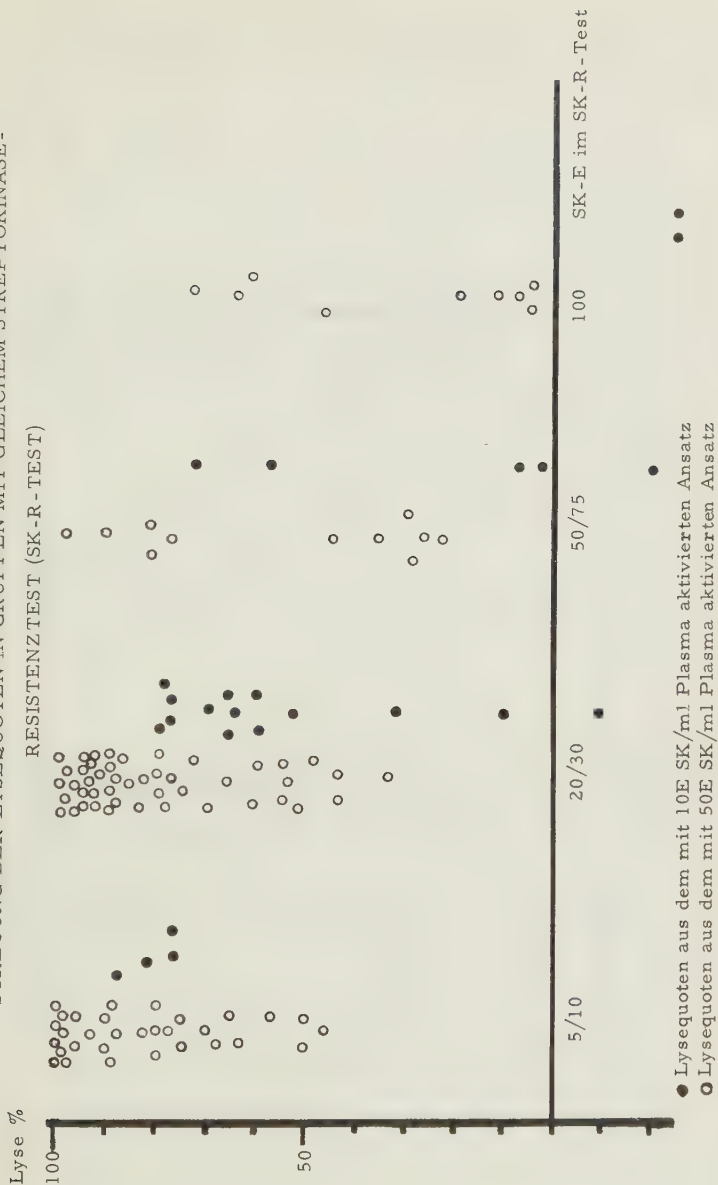


Abb. 6: die "negativen Lysewerte" in dieser Abbildung bedeuten, daß das Fibrinpapier trotz der Inkubation in aktiviertem Plasma eine höhere Extinktion zeigt als der 0 % -Lyse - Kontrollwert.

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER SPONTANFIBRINOLYSE,
DEM STREPTOKINASERESISTENZTEST UND DER PAPIERFIBRINOLYSE

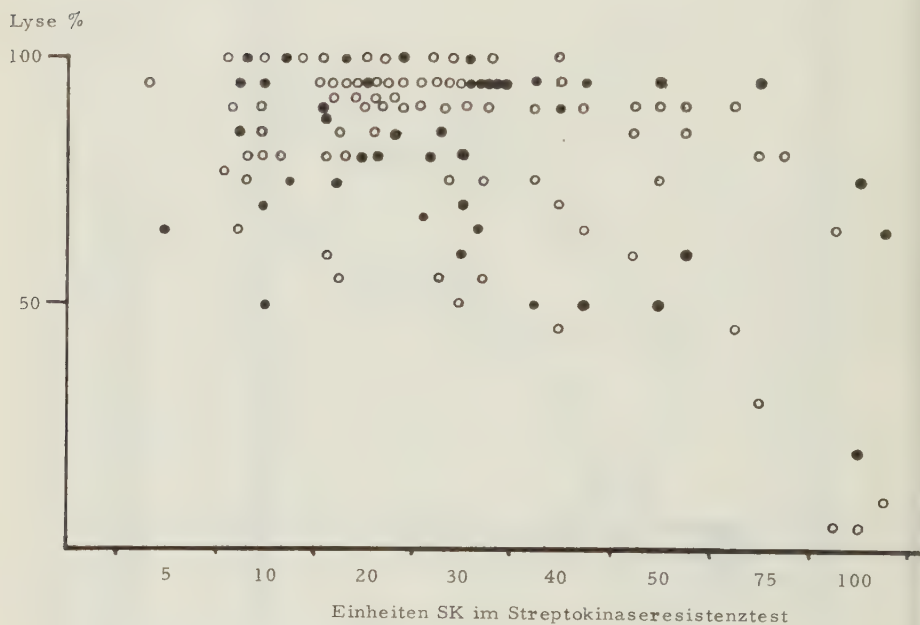


Abb. 7

- Lysequoten, bei denen die Plasmen auch Spontanlyse zeigten
- Lysequoten, bei denen die Plasmen keine Spontanlyse zeigten

STREUUNG DER LYSEQUOTEN INNERHALB EINZELNER KRANKHEITSGRUPPEN

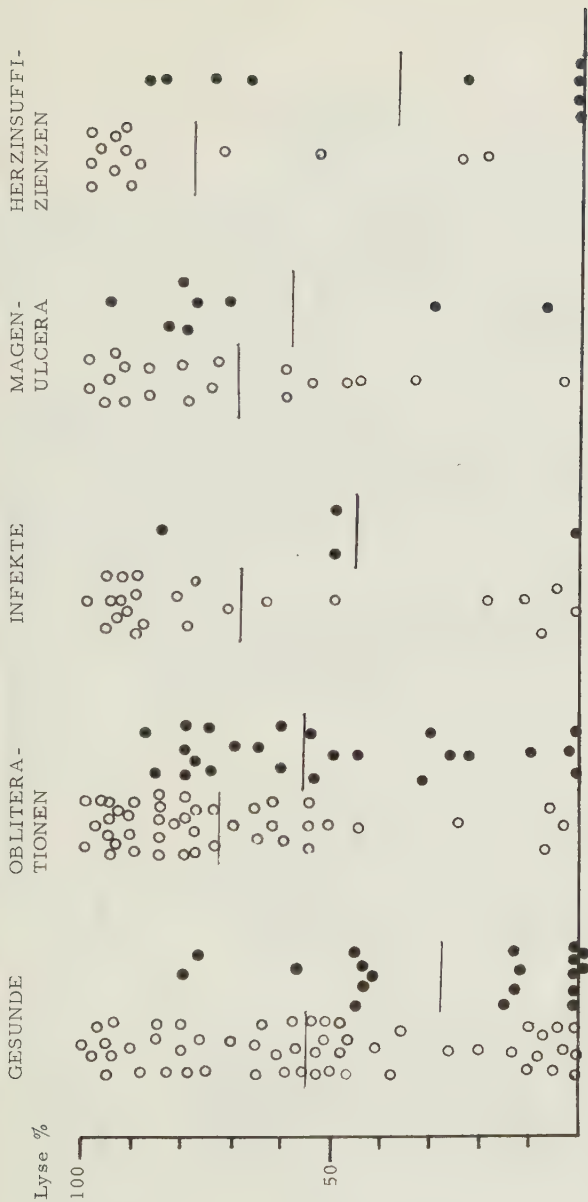


Abb. 8

● Lysequoten aus dem mit 10 E SK/ml Plasma aktivierten Ansatz
 ○ Lysequoten aus dem mit 50 E SK/ml Plasma aktivierten Ansatz
 Der waagerechte Strich bedeutet den Mittelwert einer Gruppe.

DURCHSCHNITTliche LYSEQUOTEN DER NACH DEKADEN EINGETEILTEN LEBENSALTER BEI EINIGEN PROBANDENGRUPPEN

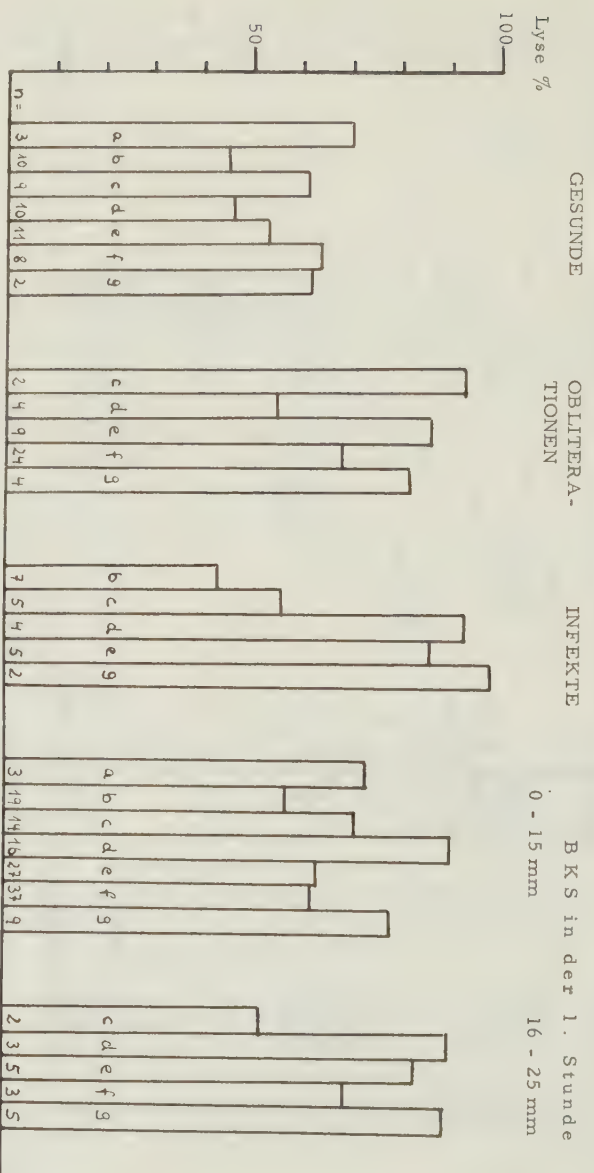


Abb. 9: die Ergebnisse wurden mit dem 50 E SK/ml Plasma - Ansatz gewonnen. Die einzelnen Säulen bedeuten jeweils eine Dekade und zwar: a=10-19, b=20-29, c=30-39, und g=70-79 Jahre. Am Fuße der Säulen ist die Anzahl (n) der Probanden der jeweiligen Dekade angegeben. Durchschnittsalter und Durchschnittslyse sind aus Tabelle XIII bzw. XIV zu ersehen.

LEBENS LAUF

Ich, Eberhard Rüdiger Scholle, wurde am 10.8.1936 als erstes von drei Kindern des Chemikers Dr. -Ing. Richard Scholle und seiner Ehefrau Erna, geb. Hesse in Berlin geboren.

Ab 1942 besuchte ich in Celle die Volksschule. Ostern 1947 wurde ich auf das Gymnasium Ernestinum in Celle aufgenommen. Ab Januar 1950 besuchte ich dann das Ratsgymnasium in Hannover und ab Ostern 1955 die Humboldt-Schule in Wilhelmshaven, wo ich auch 1957 meine Reifeprüfung ablegte.

Mein Medizinstudium begann ich 1957 an der Hamburger Universität, dort legte ich im März 1960 die ärztliche Vorprüfung ab. Im Mai 1960 setzte ich mein Medizinstudium in den klinischen Fächern in München fort. Im Sommer 1963 legte ich das medizinische Staatsexamen an der Universität in München ab.

Seit dem 1. Oktober 1963 bin ich als Medizinalassistent an der Städtischen Frauenklinik in Stuttgart tätig.

